

## Rassegna

# Interferenze nella determinazione della glicemia effettuata con i glucometri elettrochimici nel paziente ospedalizzato

### RIASSUNTO

La misura rapida e accurata della glicemia è di fondamentale importanza per il controllo ospedaliero o per l'autocontrollo domiciliare dei pazienti diabetici. Un efficace supporto a questa attività è fornito dai glucometri, dispositivi economici, specifici e dotati di un'ottima sensibilità di risposta. È necessario, però, considerare che i pazienti, ma a volte anche il personale sanitario, ignorano alcuni errori di misura, dovuti a interferenze, a cui questi dispositivi possono andare incontro. Tali interferenze possono alterare la correttezza dei risultati, esponendo i pazienti a conseguenze clinico-terapeutiche anche gravi, legate a un'errata valutazione dello stato glicemico. In questo articolo sono descritti i principi base dei biosensori amperometrici che costituiscono il dispositivo sensibile di qualsiasi glucometro commerciale. Per ciascuna tipologia di glucometro sono state evidenziate le possibili fonti di interferenza nella misura del glucosio. Queste informazioni serviranno per fornire le giuste raccomandazioni, sia ai pazienti sia ai curanti, nella scelta del dispositivo più adatto alla particolare situazione clinico-terapeutica.

### SUMMARY

*Interferences on glycemic control performed by electrochemical glucometers in the hospitalized patient*  
Fast and accurate glycemia measurements are fundamental for diabetic patients in both hospital and home controls. An efficient support to this practice is represented by commercial glucometers that are low cost devices possessing specificity and high response sensitivity. It should be noticed that patients, and sometimes sanitary personnel, are not aware of some possible measurement errors, which are shown by these devices in the presence of interferences. Such errors can compromise the trueness of glycemia values, thus potentially leading to inappropriate clinical interventions. In this review we describe the basic concepts of amperometric biosensors, which represent the focal part of any commercial glucometers. For each kind of electrochemical glucometer, the possible sources of interferences in the glucose measurement have been discussed. These information can be used to give recommendations, either for patients or for physicians, in the choice of the most useful glucometer for the particular clinical-therapeutical condition.

**D. Centonze, M. Quinto, D. Carelli,  
S. Di Paolo<sup>1</sup>, E. Montemurno<sup>1</sup>, L. Gesualdo<sup>1</sup>**

DiSACD – Dipartimento di Scienze Agro-ambientali, Chimica e Difesa Vegetale e Centro Interdipartimentale Bioagromed, Università degli Studi di Foggia, Foggia;  
<sup>1</sup>Struttura Complessa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Azienda Ospedaliero-Universitaria "OO.RR", Università degli Studi di Foggia, Foggia

Corrispondenza: prof. Diego Centonze,  
DiSACD – Dipartimento di Scienze Agro-ambientali,  
Chimica e Difesa Vegetale e Centro Interdipartimentale  
Bioagromed, Università degli Studi di Foggia,  
via Napoli 25, 71100 Foggia

G It Diabetol Metab 2006;26:160-171

*Pervenuto in Redazione il 3-8-2006  
Accettato per la pubblicazione il 7-11-2006*

Parole chiave: glucometri, biosensori elettrochimici, interferenze

Key words: glucometers, electrochemical biosensors, interferences

## Introduzione

Il diabete rappresenta una delle principali patologie nel mondo occidentale e, con il passare degli anni, si registra un aumento vertiginoso del numero di soggetti affetti. La patologia diabetica è sempre associata, nel medio-lungo termine, all'insorgenza di complicanze multiorgano, in parte correlate a cause immodificabili (correlate al genotipo), in parte modulabili (abitudini di vita, controllo glicometabolico della malattia, trattamento delle sue complicanze ecc.). Di conseguenza, tutte le più autorevoli associazioni diabetologiche, nazionali e internazionali, sottolineano il ruolo cruciale dello stretto controllo dei valori glicemici nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 e di tipo 2, al fine di ridurre o almeno ritardare l'insorgenza di patologie diabetico-associate (retinopatia, nefropatia, neuropatia ecc.). Attualmente, studi clinici di rilevante portata considerano l'autocontrollo dei valori glicemici, utilizzando glucometri manuali, il principale mezzo di prevenzione secondaria delle complicanze della malattia diabetica.

Nonostante i continui miglioramenti di sensibilità e specificità apportati ai glucometri attualmente disponibili in commercio, sussistono ancora particolari condizioni patologiche, clinico-metaboliche o farmacologiche, che possono interferire in una corretta valutazione dei livelli di glucosio ematico.

Studi riportati di recente in letteratura dimostrano<sup>1-6</sup> la particolare attenzione rivolta all'identificazione dei potenziali fattori interferenti nella misurazione della concentrazione di glucosio ematico con i glucometri, in particolare nel settore "area critica", dove lo stato clinico dei pazienti e la contemporanea somministrazione di particolari farmaci (per es., acido ascorbico, dopamina, paracetamolo, mannitolo ecc.) possono comportare rilevanti errori di valutazione, causa potenziale di interventi terapeutici non adeguati.

Per esempio, l'acido ascorbico, utilizzato comunemente in clinica, e in particolare nelle condizioni ad aumentata richiesta nutrizionale-metabolica, è in grado di interferire nella determinazione della glicemia<sup>5</sup>.

Anche in particolari condizioni cliniche o patologiche si possono verificare delle interferenze, con conseguente sovrastima della glicemia. Nell'insufficienza renale cronica, una delle principali complicanze croniche del diabete, si verifica, infatti, un aumento dei valori ematici di urea, che interferisce con la misura del glucosio<sup>6</sup>.

D'altro canto, non può essere ignorato che molti pazienti in "area critica" (terapie intensive generali e specialistiche) vanno incontro, anche solo transitoriamente, a insufficienza renale acuta e, conseguentemente, a marcata iperazotemia il più spesso amplificata dal concomitante deficit energetico-nutrizionale, causa di marcato catabolismo proteico.

In Italia circa 44.000 pazienti sono in trattamento dialitico periodico e di questi circa il 10% è in dialisi peritoneale. In questi pazienti vengono talora utilizzati liquidi di dialisi contenenti icodestrine, un polimero del glucosio che viene successiva-

mente idrolizzato a maltosio, maltotriosio e maltodestrosio, i quali a loro volta reagiscono aspecificamente con diversi glucometri, fornendo così una sovrastima dei valori di glicemia. Dagli esempi sopra riportati, si evince che il monitoraggio del glucosio nel paziente in "area critica" e nel paziente in terapia intensiva necessita di dispositivi analitici affidabili, con basso rischio di interferenza e dotati di risposte veloci. Attualmente sono disponibili in commercio vari tipi di glucometri (Tab. 1), basati su sistemi di lettura ottici (reflettometrici) o elettrochimici, che impiegano come elemento sensibile al glucosio un enzima. Di seguito sono descritte alcune caratteristiche e i principi di funzionamento dei glucometri elettrochimici disponibili nella pratica clinica, che si presentano come potenziali strumenti diagnostici altamente sensibili e specifici, in grado di ridurre al minimo le interferenze strumentali e, quindi, il rischio di valutazioni erronee.

## Biosensori elettrochimici: principio base di funzionamento dei glucometri impiegati in diabetologia

La semplificazione di un metodo analitico in modo che le misure dei parametri clinici, in particolare il glucosio, diventino veloci e di routine, preferibilmente senza alcun pretrattamento del campione e con competenze minime da parte dell'operatore, è un obiettivo per tutta la chimica analitica moderna. A tal proposito, molti studi sono stati rivolti alla messa a punto di metodiche analitiche altamente selettive, basate, quindi, sull'uso di reagenti che possono essere considerati a loro volta selettivi. Reagenti straordinariamente selettivi e versatili sono offerti proprio dalla natura sotto forma di enzimi, anticorpi, recettori ecc.; i suddetti componenti biologici possono essere integrati con diversi trasduttori chimico-fisici al fine di ottenere particolari dispositivi analitici: i biosensori (Fig. 1), che consentono di avere risultati sia qualitativi sia quantitativi di enorme interesse scientifico e applicativo<sup>7-9</sup>. I sistemi di bioriconoscimento consistono tipicamente di enzimi e anticorpi, ma possono includere anche acidi nucleici, batteri, organismi unicellulari e, spesso, tessuti di organismi pluricellulari<sup>10</sup>. I sistemi di trasduzione<sup>11</sup> possono essere di vari tipi (elettrochimici, piezoelettrici, optoelettronici, ottici, calorimetrici ecc.) a seconda dei parametri da misurare (corrente, conduttanza, impedenza, differenza di potenziale, variazione di massa, luce, calore ecc.).

Tra le possibili combinazioni biocomponente-trasduttore, la più studiata e riportata in letteratura è quella che impiega enzimi redox e rivelatori elettrochimici<sup>11</sup>. I trasduttori amperometrici rappresentano, infatti, i rivelatori più economici e facilmente costruibili, mentre gli enzimi ossidoriduttasi (Fig. 2) sono una classe di elementi di riconoscimento molecolare ben conosciuta e facilmente reperibile in commercio; tali

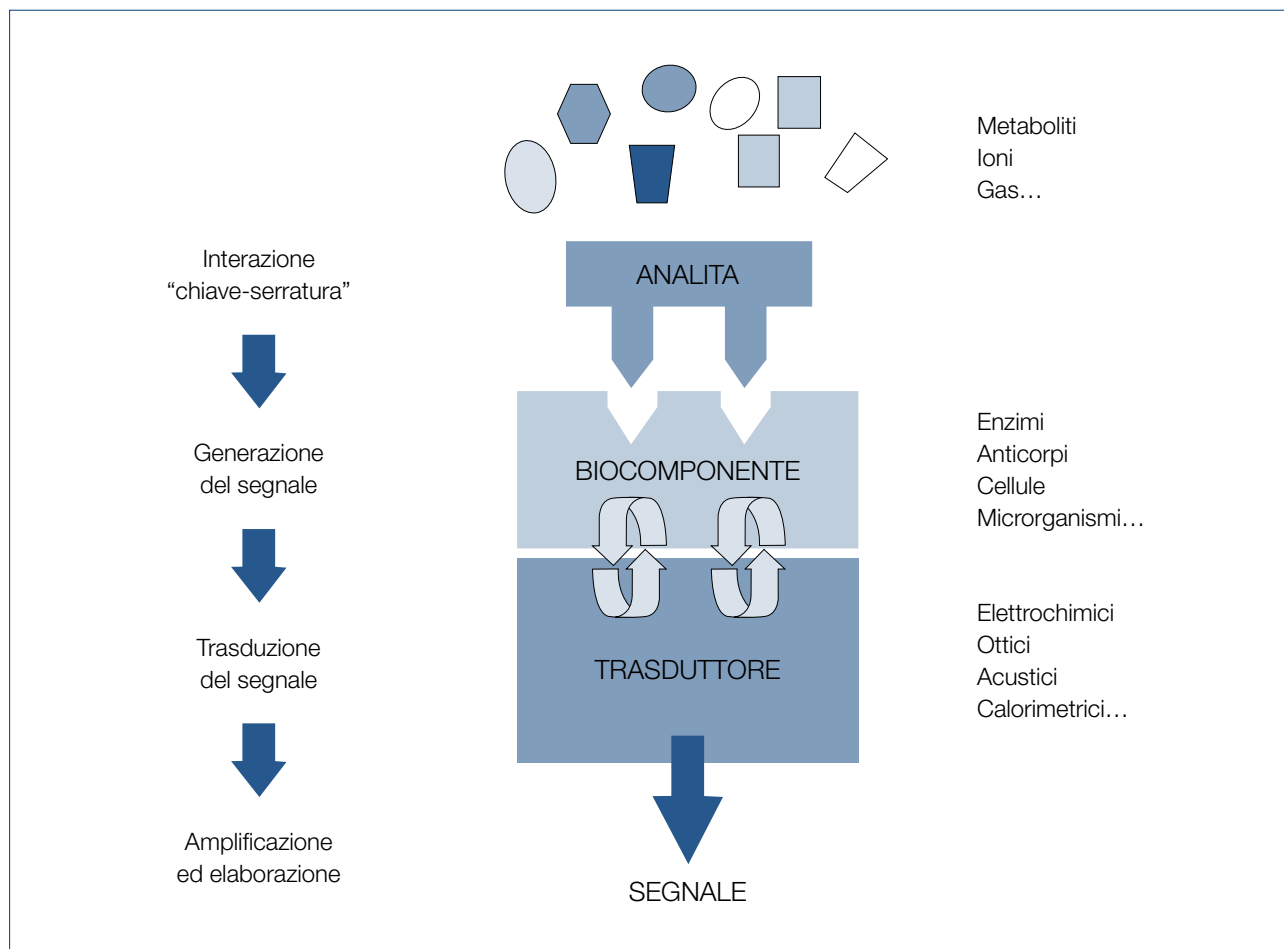
**Tabella 1** *Glucometri commerciali.*

	Accu-Chek Advantage Accu-Chek Comfort Accu-Chek Sensor	Accu-Chek Compact	Accu-Chek Compact Plus	Accu-Chek Active	Accu-Chek Aviva	One Touch Profile	SureStep Plus GlucoTouch
Azienda	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	Roche Diagnostics	LifeScan	LifeScan
Volume del campione	4 µl	1,5 µl	1,5 µl	2 µl (1µl, se campione deposto al centro)	0,6 µl	5 µl	10 µl
Tempo di misura	26 sec	8 sec	5 sec	5 sec interno 10 sec esterno	5 sec	45 sec	15-30 sec
Range di misura mg/dl mmol/L	10-600 0,55-33,3	10-600 0,55-33,3	10-600 0,55-33,3	10-600 0,55-33,3	10-600 0,55-33,3	0-600 0-33,3	0-500 0-27,7
Range di temperatura	57-104 °F 14-40 °C	50-104 °F 10-40 °C	50-104 °F 10-40 °C	50-104 °F 10-40 °C	42-111 °F 6-44 °C	59-95 °F 15-35 °C	50-95 °F 10-35 °C
Principio di funzionamento	Elettrochimico	Ottico	Ottico	Ottico	Elettrochimico	Ottico	Ottico
Enzima	GDH	GDH	GDH	GDH	GDH	GOD	GDH
Range di ematocrito	20-65 (< 200) 20-55 (> 200)	25-65	25-65	Esterno 20-70 Interno 30-55	20-70	25-60	25-60
Range di umidità	< 85%	< 85%	< 85%	< 85%	10-90%	0-90%	10-90%
Striscia reattiva	Accu-Chek Advantage o Accu-Chek Sensor	Accu-Chek Compact	Accu-Chek Compact	Accu-Chek Active	Accu-Chek Aviva	One Touch	SureStep
Sito web del produttore <a href="http://www.lifescan.com">http://www.lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>

	OneTouch FastTake EuroFlash PocketScan SmartScan	OneTouch Ultra	OneTouch Ultra 2	OneTouch UltraSmart	OneTouch Horizon	Medisense Precision QID QID Pen	Precision Xtra Optium Xceed Optium Plus
Azienda	LifeScan	LifeScan	LifeScan	LifeScan	LifeScan	Abbott Diabetes Care	Abbott Diabetes Care
Volume del campione	1,5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1,5 µl	3,5 µl	0,6 µl glucosio 5 µl chetoni
Tempo di misura	15 sec	5 sec	5 sec	5 sec	5 sec	20 sec	5 sec glucosio 30 sec chetoni
Range di misura mg/dl mmol/L	20-600 1,1-33,3	20-600 1,1-33,3	20-600 1,1-33,3	20-600 1,1-33,3	10-600 0,55-33,3	20-600 1,1-33,3	20-500 1,1-27,8
Range di temperatura	59-95 °F 15-35 °C	43-111 °F 6-44 °C	43-111 °F 6-44 °C	42-111 °F 6-44 °C	54-108 °F 12-42 °C	64-86 °F 18-30 °C	50-122 °F 10-50 °C
Principio di funzionamento	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico
Enzima	GOD	GOD	GOD	GOD	GOD	GOD	GDH
Range di ematocrito	30-55	30-55	30-55	30-55	30-55	20-70	20-70 (< 300) 20-60 (> 300)
Range di umidità	10-90%	10-90%	10-90%	10-90%	10-90%	10-90%	10-90%
Striscia reattiva	OneTouch FastTake EuroFlash PocketScan	One Touch Ultra	One Touch Ultra	One Touch Ultra	OneTouch Horizon	Precision QID Precision Plus	New Precision Xtra e MediSense Optium Plus
Sito web del produttore <a href="http://www.lifescan.com">http://www.lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>	<a href="http://www.lifescan.com">lifescan.com</a>

	Precision Easy Optium Easy TrueSense	FreeStyle	FreeStyle Flash Papiion Mini	FreeStyle Freedom	Ascensia Elite Elite XL	Ascensia Dex 2 Esprit 2 Dexter Z2	Ascensia Breeze Confirm
Azienda	Abbott Diabetes Care	Abbott Diabetes Care	Abbott Diabetes Care	Abbott Diabetes Care	Bayer	Bayer	Bayer
Volume del campione	2,5 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	2 µl	3-4 µl	~2,5-3,5 µl
Tempo di misura	20 sec	7 sec	7 sec	5 sec	30 sec	30 sec	30 sec
Range di misura mg/dl mmol/L	20-500 1,1-27,8	20-500 1,1-27,8	20-500 1,1-27,8	20-500 1,1-27,8	10-600 0,55-33,3	10-600 0,55-33,3	10-600 0,6-33,3
Range di temperatura	59-104 °F 15-40 °C	59-104 °F 15-40 °C	59-104 °F 15-40 °C	40-105 °F 5-40 °C	50-104 °F 10-40 °C	50-104 °F 10-40 °C	50-104 °F 10-40 °C
Principio di funzionamento	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico
Enzima	GDH	GDH	GDH	GDH	GOD	GOD	GOD
Range di ematocrito	20-70	0-60	0-60	15-65	20-60 (<300)	20-60	20-55
Range di umidità	10-90%	5-90%	5-90%	5-90%	20-80%	10-80%	10-80%
Striscia reattiva	True Measure	FreeStyle	FreeStyle	FreeStyle	Ascensia Elite	Ascensia Dex 2 Esprit 2 Autodisc bG Strips	Ascensia Glucodisc Autodisc bG Strips
Sito web del produttore <a href="http://www.abbottdiabetescare.com">http://www.abbottdiabetescare.com</a>	<a href="http://www.abbottdiabetescare.com">abbottdiabetescare.com</a>	<a href="http://www.abbottdiabetescare.com">abbottdiabetescare.com</a>	<a href="http://www.abbottdiabetescare.com">abbottdiabetescare.com</a>	<a href="http://www.abbottdiabetescare.com">abbottdiabetescare.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>

	Ascensia Contour	Ascensia Entrust	Ascensia BRIO	Glucomen PC	Glucocard G
Azienda	Bayer	Bayer	Bayer	A. Menarini	A. Menarini
Volume del campione	0,6 µl	3 µl	3 µl	3 µl	0,3 µl
Tempo di misura	15 sec	30 sec	10 sec	30 sec	5 sec
Range di misura mg/dl mmol/L	10-600 0,6-33,3	30-550 1,7-30,6	30-550 1,7-30,6	20-600 1,1-33,3	10-600 0,6-33,3
Range di temperatura	50-104 °F 10-40 °C	64-100 °F 18-38 °C	57-104 °F 14-40 °C	59-86 °F 15-30 °C	50-104 °F 10-40 °C
Principio di funzionamento	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico	Elettrochimico
Enzima	GDH	GOD	GOD	GOD	GDH
Range di ematocrito	20-60	30-55	30-55	20-60	30-55
Range di umidità	10-93%	< 93%	< 85%	20-80%	20-80%
Striscia reattiva	Ascensia Microfill	Ascensia Entrust bG test strips	Ascensia EASYFILL	Glucomen Sensor	Glucocard G
Sito web del produttore <a href="http://www.ascensia.com">http://www.ascensia.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>	<a href="http://www.ascensia.com">ascensia.com</a>	<a href="http://www.menarini.com">menarini.com</a>	<a href="http://www.menarini.com">menarini.com</a>



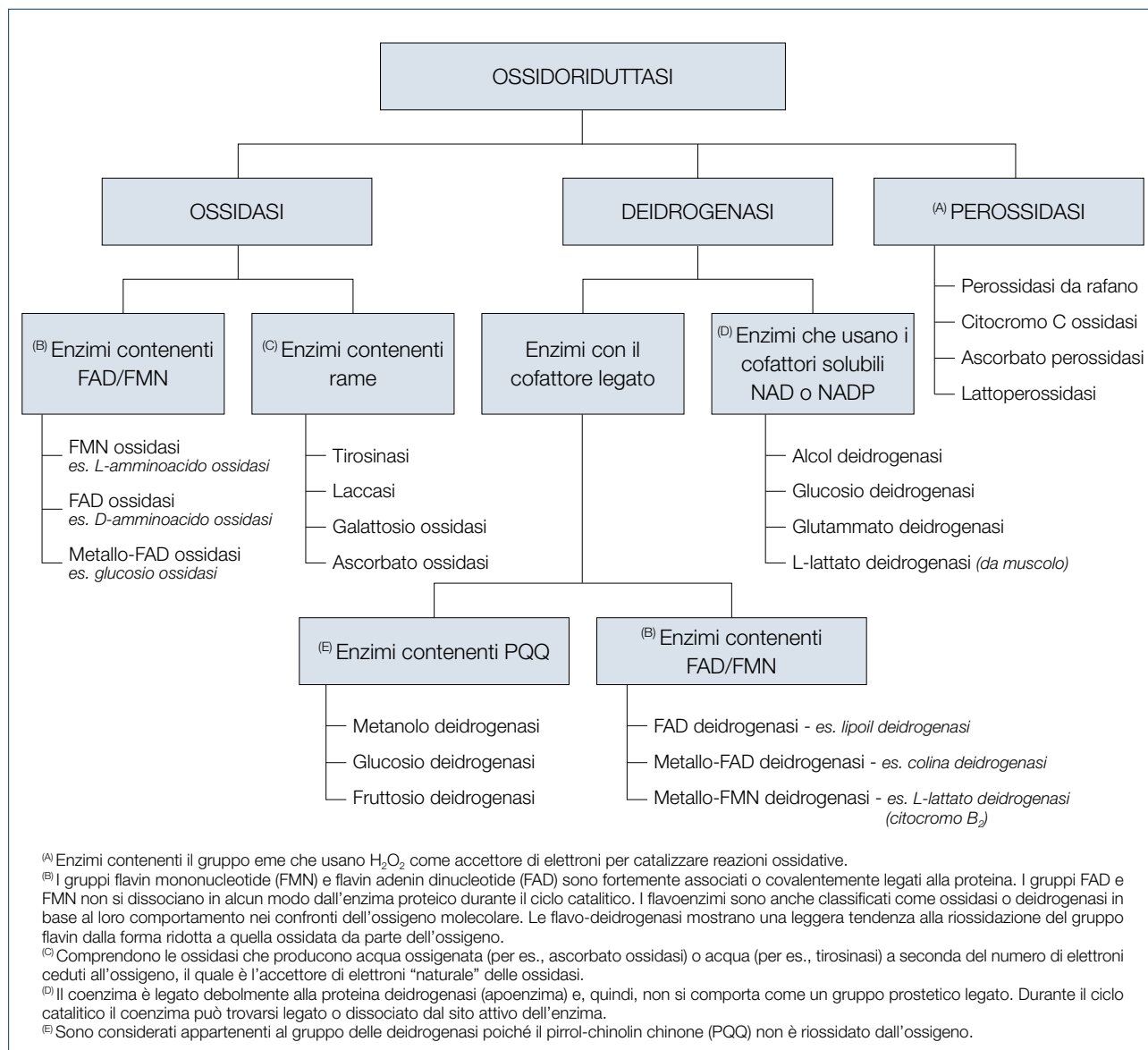
**Figura 1** Un biosensore può essere definito, secondo recenti raccomandazioni della IUPAC, come “un dispositivo analitico compatto incorporante un elemento sensibile costituito da un componente biologico con proprietà di riconoscimento molecolare, immobilizzato su un trasduttore chimico-fisico, che converte il segnale biochimico in segnale elettrico”.

caratteristiche sono, dunque, alla base della diffusa fabbricazione di dispositivi analitici, detti biosensori amperometrici, molti dei quali sono presenti da anni in commercio (per es., i glucometri per la misura della glicemia).

Il comune schema di reazione di un biosensore amperometrico è riportato in figura 3. Come è possibile notare gli enzimi appartenenti alla classe delle deidrogenasi, dipendenti dal cofattore nicotinammide adenina dinucleotide (NAD), si comportano diversamente dagli altri enzimi poiché durante il ciclo catalitico è il coenzima, e non l'enzima stesso, a essere ridotto (ossidato), secondo il tipico meccanismo “a due substrati”<sup>12</sup>. La riossidazione della forma ridotta del coenzima (che genera il segnale analitico) richiede, su superfici di platino od oro ben pulite, l'impiego di potenziali di lavoro fino a +1 V vs Ag/AgCl. Di conseguenza, si comprende come, nel caso dell'impiego di tale classe di enzimi come biocomponenti, sia stato necessario l'utilizzo di elettrodi modificati o di effi-

cienti mediatori al fine di abbassare il potenziale di misura<sup>12</sup>. Normalmente gli enzimi appartenenti alla classe delle ossidoriduttasi non scambiano elettroni con semplici elettrodi metallici, a causa del fatto che il sito attivo degli stessi è localizzato internamente alla struttura della proteina e spesso la distanza tra il centro redox e la superficie elettrodica, durante la reazione catalitica, è troppo grande per permettere un efficiente trasferimento elettronico. Ciò implica che nel caso delle PQQ-deidrogenasi e delle flavin-ossidasi è richiesto un mediatore che trasmetta gli elettroni tra la superficie del trasduttore e l'enzima redox. In un tale tipo di processo il suddetto mediatore passa dalla forma ossidata a quella ridotta producendo un segnale analitico (corrente), mentre l'enzima reagisce con il substrato a dare il prodotto.

È noto che gli enzimi appartenenti alla classe delle ossidasi, incorporati in dispositivi amperometrici quali i biosensori, usano l'ossigeno molecolare come accettore “naturale” di



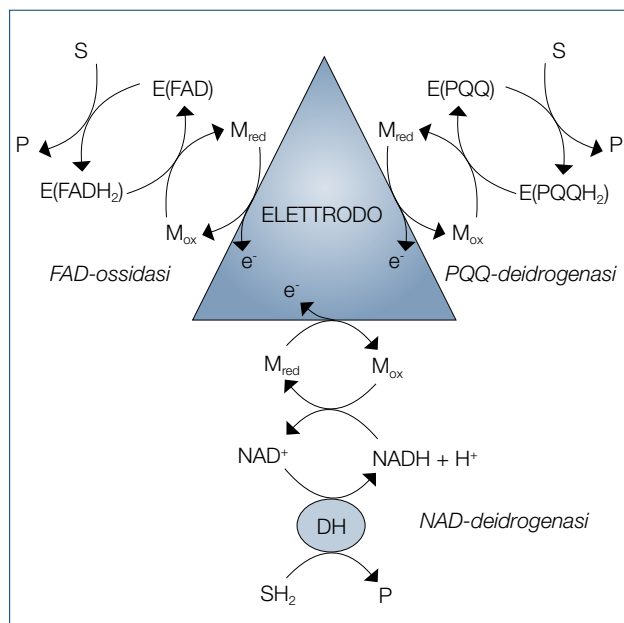
**Figura 2** Classificazione schematica degli enzimi ossidoriduttasi, impiegati nella fabbricazione di biosensori amperometrici, in base alla natura dell'accettore di elettroni e/o alla natura del gruppo prostetico.

elettroni, producendo acqua ossigenata come prodotto della reazione enzimatica; l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ottenuta può essere monitorata (amperometricamente) mediante un trasduttore elettrochimico (elettrodo indicatore).

La rivelazione dell'acqua ossigenata prodotta dalla reazione enzimatica presenta, comunque, diversi inconvenienti: 1) la risposta dipende dall'ossigeno presente nell'ambiente di reazione; 2) le misure dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> richiedono sia l'impiego di superfici elettrodiche a elevata attività elettrocatalitica (Pt, Pt/Ir) sia potenziali di lavoro di +0,7 V vs Ag/AgCl che possono determinare l'ossidazione di diverse specie elettroattive interferenti (la specificità dell'enzima viene inficiata dalla scarsa

specificità del trasduttore); 3) elevate concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel mezzo di reazione possono degradare alcuni enzimi (per es., la glucosio ossidasi, GOD).

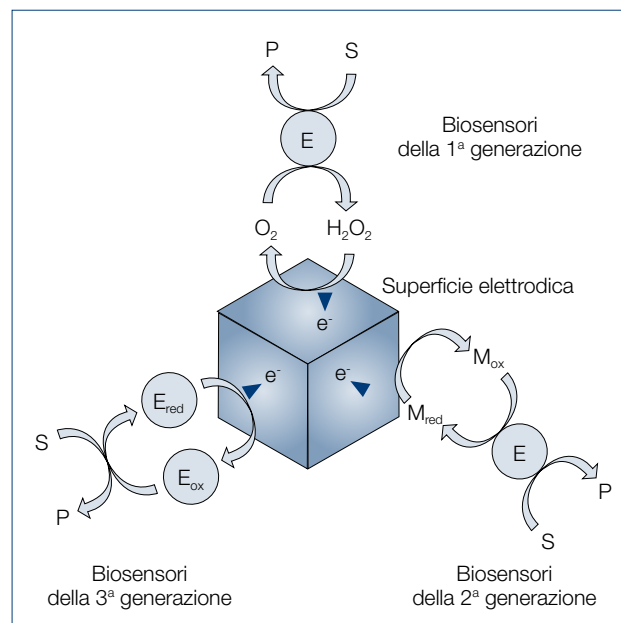
Per superare, o anche solo minimizzare, i problemi appena descritti sono stati effettuati diversi tentativi<sup>12</sup>, quali quello di sostituire l'ossigeno con mediatori artificiali assai diffusi come il ferrocene, l'esacianoferrato e varie sostanze chinoniche od organiche che hanno portato alla messa a punto di dispositivi detti biosensori di "2<sup>a</sup> generazione" (Fig. 4). Una specie però, per poter essere considerata un buon mediatore artificiale, e poter quindi competere con l'ossigeno efficacemente, deve presentare un'elevata velocità di scambio elettronico con



**Figura 3** Schema di reazione dei biosensori amperometrici che impiegano un enzima ossidoriduttasi. *S*,  $SH_2$ : substrato dell'enzima; *P*: prodotto della reazione enzimatica; *E*(FAD), *E*(PQQ): forma ossidata dell'enzima; *E*(FADH<sub>2</sub>), *E*(PQQH<sub>2</sub>): forma ridotta dell'enzima; NAD, NADH: forma ossidata e ridotta del cofattore enzimatico; DH: deidrogenasi NAD-dipendente;  $M_{ox}$ ,  $M_{red}$ : forma ossidata e ridotta del mediatore. È da notare che l'enzima tipicamente è immobilizzato sulla superficie elettrodica mentre il mediatore può essere sia nella forma solubile sia immobilizzato all'interno del sistema dell'enzima stesso. In tal caso il processo di trasferimento elettronico dipenderà da quanto è eterogenea la mediazione e va distinto dal caso in cui sia l'enzima sia il mediatore sono nella forma solubile (mediazione omogenea).

l'enzima, deve essere stabile e non tossica, e infine deve possedere un basso potenziale di ossidoriduzione adatto a eliminare le altre specie elettroattive e, quindi, l'interferenza aspecifica a loro legata.

A parte l'uso di mediatori artificiali sono stati tentati altri approcci per ovviare ai problemi descritti: il cointrappolamento del mediatore e dell'enzima<sup>13,14</sup>; l'uso di enzimi modificati con mediatori intrappolati in polimeri conduttori<sup>15,16</sup>; l'uso di mediatori legati covalentemente con i polimeri intrappolanti l'enzima<sup>17</sup>; l'uso di enzimi modificati con relè elettronici<sup>18</sup> o elettricamente attivati mediante osmio contenuto in un polimero redox<sup>19,20</sup>. Nonostante uno dei biosensori di maggior successo presente in commercio per la rivelazione del glucosio impieghi un mediatore artificiale<sup>8</sup>, i tentativi di sostituire il mediatore naturale nella fabbricazione dei biosensori amperometrici non sempre sono andati a buon fine, poiché spes-



**Figura 4** Schema generale di reazione dei biosensori amperometrici di prima, seconda e terza generazione.

so gli obiettivi cruciali, quali la stabilità, la non dipendenza dall'ossigeno, l'elevata velocità di trasferimento elettronico e l'eliminazione degli interferenti elettroattivi non sempre sono stati raggiunti. In particolare, nel caso degli enzimi elettricamente collegati<sup>19,20</sup> solo il 20% degli enzimi attivi viene elettrossidato per mezzo dell'Os(III) in soluzione e in assenza di ossigeno.

In ragione di quanto riportato, la maggior parte dei biosensori presenti in commercio è basata sull'impiego di tre membrane convenzionali ciascuna delle quali ha uno specifico ruolo: l'immobilizzazione enzimatica (mediante intrappolamento fisico o legami covalenti); l'eliminazione degli interferenti elettroattivi; la reazione delle specie a elevato peso molecolare che possono provocare un avvelenamento elettrodico; la modulazione dei flussi relativi di substrato e ossigeno allo scopo di aumentare l'intervallo di risposta lineare.

Ovviamente anche tale approccio presenta diversi problemi quali: 1) tecniche di fabbricazione limitate dall'impiego di superfici bidimensionali; 2) difficoltà di miniaturizzazione; 3) difficoltà nell'ottenere un modello di diffusione riproducibile; 4) tempi di risposta molto lunghi; 5) eliminazione del segnale dovuto ad alcune fra le più comuni specie interferenti presenti nel sangue (acetaminofene) del tutto insoddisfacente.

Per superare tali problemi è stato proposto un approccio innovativo basato sull'uso di film polimerici permselectivi elettrosintetizzati<sup>21,22</sup>. L'immobilizzazione enzimatica viene condotta a partire da una soluzione contenente sia l'enzima sia il monomero. L'enzima viene assorbito sull'elettrodo e la successiva polimerizzazione elettrochimica consente di otte-

nere l'immobilizzazione del biocomponente. La caratteristica permselectività di questi polimeri permette di ottenere la diffusione del substrato e del cofattore e, nello stesso tempo, un'efficiente rimozione delle specie interferenti. La procedura elettrochimica in un unico stadio permette una facile miniaturizzazione del dispositivo e la fabbricazione di biosensori con velocità di risposta elevate<sup>23-26</sup>.

In alcuni casi è stato usato un approccio alternativo basato su una procedura a due stadi<sup>24,27,28</sup>. Nel primo viene condotta una polimerizzazione del monomero, mentre nel secondo l'enzima viene intrappolato sul film elettrosintetizzato mediante "co-crosslinking" con glutaraldeide e albumina di siero bovino. Il film permselectivo svolge due funzioni: garantisce l'efficiente rimozione degli interferenti e agisce da miglior supporto per l'intrappolamento del biocomponente.

Per mezzo degli approcci appena descritti sono stati fabbricati diversi biosensori per le analisi cliniche, ambientali e alimentari, basati su strutture mono- o multistrato e contenenti uno o più enzimi. Tali biosensori possono essere facilmente realizzati su substrati miniaturizzati o su elettrodi a strato sottile che possono essere integrati in sistemi in flusso per analisi di campioni reali<sup>24,26,29</sup>.

Di grande supporto alle tecniche di realizzazione dei biosensori sono i recenti sviluppi della microelettronica, che hanno permesso la realizzazione di microchip nei quali, in spazi ridottissimi, è possibile inserire un numero relativamente elevato di elettrodi, ciascuno con caratteristiche e funzioni proprie. Se un elettrodo è in grado di misurare la corrente relativa sia all'analita di riferimento sia agli interferenti, mentre un secondo misura solo gli interferenti, la differenza di questi due segnali restituisce il valore di corrente attribuibile solo all'analita in esame. Per evitare fenomeni di polarizzazione elettrodica e di avvelenamento superficiale (*fouling*), la misura del segnale interferente può essere effettuata in corrente alternata. In questo caso è opportuno l'utilizzo di algoritmi ricavati sperimentalmente per risalire al valore di corrente specifico dell'analita in esame.

## Glucometri elettrochimici commerciali

Gli apparecchi portatili per la determinazione rapida del glucosio, i glucometri, costituiscono il mezzo indispensabile per il controllo glicemico non solo da parte del paziente diabetico, ma anche da parte del personale sanitario che opera nelle unità di terapia intensiva. I glucometri attualmente in commercio sono strumenti economici, specifici e dotati di un'ottima sensibilità; essi consentono di misurare la glicemia su sangue intero, di solito su una goccia di sangue capillare, ottenuto dalla puntura del polpastrello, che viene posta su una striscia reattiva inserita nello strumento di lettura. Deve, però, essere tenuto in considerazione che a volte i pazienti, ma spesso anche il personale sanitario, ignorano

alcuni errori di misura dovuti a interferenze, a cui questi dispositivi possono andare incontro. Tali interferenze possono alterare la correttezza dei risultati, esponendo i pazienti a conseguenze clinico-terapeutiche molto critiche, legate a un'errata valutazione dello stato glicemico. I biosensori per il glucosio utilizzati nei glucometri attualmente in commercio sono di 2<sup>a</sup> generazione e i reattivi (biocomponente, cofattore e mediatore) sono tipicamente immobilizzati fisicamente sulla superficie dell'elettrodo trasduttore, mediante l'impiego di membrane discrete o mediante la tecnica dello *screen-printing*<sup>30</sup>. Il principio su cui si basa la misura dei più comuni glucometri elettrochimici presenti in commercio consiste nella quantificazione della corrente generata in conseguenza di un evento biologico, una reazione enzimatica ossidativa che risulta proporzionale alla concentrazione del glucosio nel fluido analizzato. La reazione avviene ponendo un campione di sangue su una striscia reattiva contenente uno dei sistemi enzimatici descritti di seguito, che opera secondo uno dei meccanismi riportati in figura 3.

In generale, l'errore di sovrastima della concentrazione del glucosio può avere una duplice origine: derivare da una non elevata selettività dell'enzima verso il glucosio ("interferenza biologica"), in quanto l'enzima ossida anche altri substrati; derivare da interferenze elettrochimiche, dovute a sostanze elettroattive presenti nel sangue, di natura sia endogena (per es., acido ascorbico, bilirubina, glutazione, cisteina e acido urico) sia esogena (per es., farmaci come l'acetaminofene) che ossidandosi all'elettrodo trasduttore producono una corrente aspecifica non correlata alla concentrazione dell'analita, ma proporzionale a quella dello stesso interferente.

L'errore di sottostima della concentrazione del glucosio si può verificare nei sistemi basati sulla GOD a causa di particolari meccanismi di reazione che saranno discussi in seguito.

## Glucometri basati sulla glucosio ossidasi (GOD)

La stabilità, la reperibilità, l'economicità, nonché l'attività catalitica della glucosio ossidasi (GOD) hanno consentito sin dagli anni '80 un ampio utilizzo di questo enzima nello sviluppo di vari biosensori per la determinazione di glucosio in matrici alimentari e in fluidi biologici, come dimostrato<sup>31</sup> dall'elevato numero di pubblicazioni scientifiche sull'argomento. Tra queste, in particolare, spiccano i lavori relativi alla realizzazione e caratterizzazione di biosensori amperometrici che sono il cuore dei glucometri elettrochimici. I glucometri basati sulla glucosio ossidasi (GOD), enzima particolarmente specifico per il  $\beta$ -D-glucosio, non presentano problemi di "interferenza biologica". In questi dispositivi, che non utilizzano delle efficienti membrane antinterferenti, si è reso però indispensabile l'impiego di particolari schemi di reazione che consentono di abbassare il potenziale di misura della corrente, con l'intento di eliminare le interferenze di natura elettrochimica.

Gli schemi di reazione utilizzati nei glucometri basati sulla

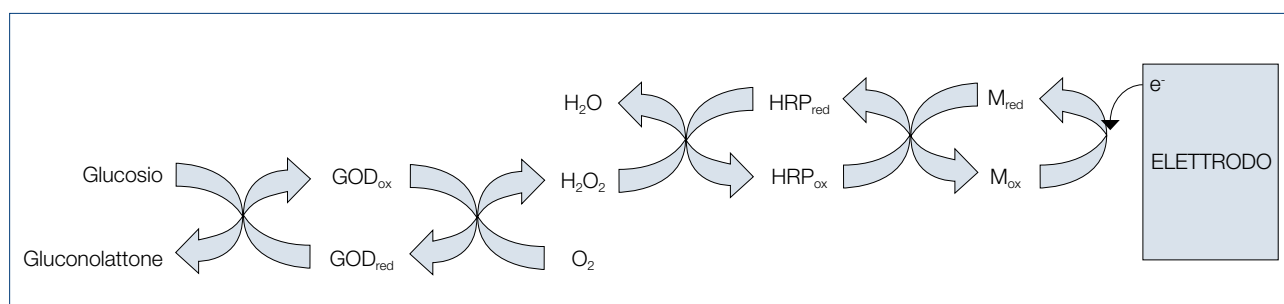
GOD prevedono un meccanismo di 2<sup>a</sup> generazione: impiego di un opportuno mediatore con o senza l'aggiunta dell'enzima perossidasi da rafano (HRP). L'impiego soltanto di mediatori artificiali, quali per esempio ferrocianuro e ferrocene, che consentono di ridurre il valore del potenziale applicato al trasduttore, rende più difficile, ma non impossibile, l'ossidazione all'elettrodo di molti interferenti: errore di misura dovuto all'interferenza elettrochimica. Tale soluzione può essere, infatti, poco efficace in quanto alcuni interferenti possono ossidarsi anche a bassi valori di potenziale, determinando una sovrastima della glicemia, o possono reagire con il mediatore riducendolo chimicamente e non rendendolo, quindi, disponibile per la riossidazione dell'enzima; questo processo produce una riduzione aspecifica della corrente di risposta e, quindi, una sottostima della glicemia.

Al fine di ottenere una più efficace riduzione del potenziale e una maggiore specificità del mediatore nella riossidazione dell'enzima, in alcuni glucometri è stato adottato l'uso dell'HRP in combinazione con la GOD e il mediatore artificiale. Il ruolo dell'HRP è quello di ridurre l'acqua ossigenata, prodotta dalle reazioni tra la GOD e il glucosio, ad acqua (Fig. 5), con conseguente produzione di una corrente di riduzione al trasduttore, proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel campione analizzato. Questo metodo permette di limitare ulteriormente le interferenze dovute all'ossidazione diretta degli interferenti sulla superficie elettrodica (sovrastima della glicemia), ma in alcuni casi (per es., in presenza di acido ascorbico) la forma ossidata della HRP viene ridotta chimicamente dall'interferente, invece di essere ridotta dal mediatore. In questo caso, a parità di concentrazioni di glucosio, la presenza di interferenti può portare a valori di corrente misurata dal trasduttore (elettrodo) inferiore a quelli attesi (sottostima della glicemia). Un'altra tipica interferenza che i glucometri basati sulla GOD possono subire è rappresentata dalla variazione della concentrazione dell'ossigeno, cofattore naturale dell'enzima. Nel caso dei sistemi basati su HRP-GOD, basse concentrazioni dell'ossigeno nel sangue, legate a particolari condizioni sia fisiologiche (altitudine) sia patologiche in cui il paziente si trova, influenzano la misura della glicemia, che sarà dipendente dalla concentrazione di ossigeno e non solo da quella del glucosio. L'ossigeno è in

grado di dare interferenze anche con i sistemi basati sulla sola GOD con il mediatore. Una sostanza redox, infatti, per poter essere considerata un buon mediatore artificiale deve poter competere efficacemente con l'ossigeno nella riossidazione dell'enzima (Fig. 4). La mancanza di questo requisito comporterebbe una riossidazione dell'enzima a spese dell'ossigeno con conseguente diminuzione della risposta in corrente (sottostima della glicemia).

### Glucometri basati sulla glucosio deidrogenasi (GDH)

Nei glucometri basati sulle deidrogenasi sono utilizzati tre differenti tipi di enzima: la glucosio 1-deidrogenasi (1-GDH), la glucosio-6-fosfato 1-deidrogenasi (G6PDH) e la chinoprotein glucosio deidrogenasi (PQQ-GDH). Come tutti gli enzimi appartenenti alla classe delle deidrogenasi (Fig. 2), essi possono avere il cofattore naturale (NAD o NADP) non legato o legato debolmente all'enzima (1-GDH e G6PDH) e che, quindi, deve essere necessariamente aggiunto nella striscia reattiva del glucometro o legato fortemente all'enzima (come nel caso della PQQ-GDH). Nella striscia reattiva (biosensore) è necessario aggiungere un mediatore artificiale in grado di riossidare il cofattore ridotto (Fig. 3). Questo schema di reazione, anche se complesso, non risente, al contrario dei sistemi basati sulla GOD, di eventuali variazioni di risposta legate alla concentrazione dell'ossigeno (altitudine e stati di ipossiemia). Il principale problema nella determinazione accurata della glicemia con questi dispositivi potrebbe derivare da una scarsa selettività dell'enzima (capacità di ossidare altri substrati diversi dal glucosio). È noto, infatti, che enzimi appartenenti alla stessa classe ma provenienti da differenti organismi possono avere un'attività biologica anche verso altri substrati, diversi da quello naturale, che possono essere talora utilizzati in alcuni preparati farmaceutici (per es., xilosio e maltosio). La 1-GDH estratta da *Thermoplasma acidophilum* e commercializzata da Sigma-Aldrich mostra<sup>32</sup>, per esempio, un'elevata attività catalitica anche nei confronti del D-galattosio. Enzimi estratti da altri organismi mostrano<sup>33</sup> un'attività catalitica anche nei confronti dello xilosio e del maltosio. Lo stesso problema si verifica per la PQQ-GDH: infatti, l'enzima ottenuto da *Acine-*



**Figura 5** Schema generale di reazione di un glucometro basato sulla glucosio ossidasi (GOD), perossidasi da rafano (HRP) e mediatore artificiale.

*tobacter calcoaceticus*<sup>33</sup> è in grado di ossidare, oltre al D-glucosio e D-galattosio, altri carboidrati quali D-xilosio, D-allosio, lattosio, maltosio, D-mannosio e D-ribosio. L'entità di questa interferenza dipende dall'affinità dell'enzima per il particolare substrato e dalla concentrazione di quest'ultimo nel fluido biologico analizzato (sangue, urine ecc.), ed essa si verifica indipendentemente dal sistema di rivelazione (trasduttore elettrochimico, ottico, calorimetrico ecc.).

Contrariamente agli altri glucometri, quelli basati sulla G6PDH non presentano questo problema, poiché lo schema di reazione prevede l'impiego di enzimi molto specifici per il substrato naturale: a opera della esochinasi (HK) il D-glucosio viene convertito nel corrispondente D-glucosio-6-fosfato, substrato della G6PDH. Il dispositivo di misura di questo tipo di glucometri richiede, quindi, l'impiego di due enzimi, due cofattori (oltre al NADP è necessario l'ATP, cofattore naturale della HK) e un mediatore, che rendono più costosa la striscia reattiva.

Le interferenze di natura elettrochimica, che dipendono dal

sistema di trasduzione (elettrodo), anche se sono meno probabili, devono essere tenute comunque in considerazione. Anche se l'impiego di un mediatore artificiale, indispensabile alla riossidazione del cofattore naturale, consente di eseguire le misure a basso potenziale, come già riportato in precedenza, alcune sostanze endogene, quali acido ascorbico, acido urico, bilirubina e glutatione, ed esogene, quali acetaminofene, possono ossidarsi all'elettrodo, determinando una sovrastima della glicemia.

## Conclusioni e prospettive future

I glucometri attualmente in commercio, dispositivi indispensabili al controllo rapido e semplice della glicemia, possono dare in alcuni casi, quali particolari situazioni fisiopatologiche o in concomitanza di trattamenti del paziente con particolari farmaci, misurazioni non attendibili della concentrazione del glucosio (Tab. 2). La sovrastima o sottostima della glicemia

**Tabella 2** Confronto degli schemi enzimatici di rivelazione dei glucometri elettrochimici commerciali in termini di errore dovuto a sostanze endogene ed esogene in particolari condizioni cliniche.

Sostanza interferente	Schema enzimatico di rivelazione <sup>(a)</sup>				Condizioni cliniche
	PQQ-GDH	GOD/HRP	GOD	1-GDH	
Acido ascorbico	Sovrastima	Sottostima	Sovrastima	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abuso nell'ingestione di vitamina C</li> <li>• Tutte le patologie che provocano aumento del valore ematico</li> </ul>
Acido urico	Sovrastima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gotta e tutte le patologie che provocano aumento del valore ematico</li> </ul>
Bilirubina	Sovrastima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia emolitica, itteri ostruttivi e tutte le patologie che provocano aumento del valore ematico</li> </ul>
Colesterolo	Sovrastima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tutte le patologie che provocano aumento del valore ematico</li> </ul>
Galattosio	Sovrastima	<sup>(b)</sup>	-	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Galattosemia</li> </ul>
Icodestrina	Sovrastima	-	-	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trattamento con soluzioni per dialisi peritoneale (per es., Extraneal)</li> </ul>
Maltosio	Sovrastima	-	-	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trattamento con soluzioni per dialisi peritoneale (per es., Extraneal)</li> <li>• Trattamento con preparati immunoglobulinici umani (per es., Octagam)</li> </ul>
Ossigeno	-	Sovrastima/sottostima	Sovrastima/sottostima	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ipossiemia, anemia, policitemia</li> <li>• Particolari condizioni di vita (per es., soggiorno in altitudine)</li> </ul>
Paracetamolo	Sovrastima/sottostima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima/sottostima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trattamento con farmaci che contengono il principio attivo</li> </ul>
Trigliceridi	Sovrastima	Sovrastima/sottostima	Sovrastima	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tutte le patologie che provocano aumento del valore ematico</li> </ul>
Xilosio	Sovrastima	-	-	Sovrastima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test orale di malassorbimento allo xilosio</li> </ul>

<sup>(a)</sup> In combinazione con l'enzima è utilizzato un mediatore artificiale; PQQ-GDH: chinoprotein glucosio deidrogenasi; GOD/HRP: glucosio ossidasi/perossidasi da rafano; GOD: glucosio ossidasi; 1-GDH: glucosio 1-deidrogenasi.

<sup>(b)</sup> Non interferisce.

dipende non solo dal particolare schema enzimatico di rivelazione, ma anche dal sistema elettronico di misurazione della corrente. I glucometri basati sulla GOD o sulle deidrogenasi possono risentire di interferenze di natura elettrochimica, dovute a sostanze endogene presenti nel sangue (per es., acido ascorbico, bilirubina, glutatione, cisteina e acido urico) o farmaci come il paracetamolo, che ossidandosi all'elettrodo determinano una misura falsata della glicemia. In alcuni dispositivi basati sulle deidrogenasi queste interferenze elettrochimiche sono state completamente eliminate con l'ausilio di particolari schemi elettronici di misurazione della corrente, mentre nel caso di glucometri basati sulla GOD, che impiegano un secondo elettrodo senza enzima, per compensare l'errore, si hanno<sup>5</sup> delle sottostime della glicemia dovute a una sovracompensazione. I glucometri a GOD mostrano, inoltre, sottostime o sovrastime della glicemia in funzione della concentrazione dell'ossigeno nel sangue, legata a particolari patologie (per es., ipossiemia) o condizioni di vita (altitudine) in cui il paziente si trova. Nella pratica clinica, alcune interferenze possono verificarsi in corso di infusione di particolari sostanze per via endovenosa (quali per esempio i preparati immunoglobulinici) o per via peritoneale (alcune soluzioni per dialisi peritoneale). In questo e altri casi, la presenza di livelli ematici di maltosio decisamente sopraffisiologici determina importanti interazioni con i glucometri che utilizzano la GDH. La conseguenza della falsa lettura in questi casi può causare seri problemi clinici, in quanto valori falsamente elevati di glicemia possono indurre il medico a somministrare dosi inappropriate di insulina con conseguente rischio di ipoglicemia. In modo simile, l'icodestrina, un polimero del glucosio che viene degradato in maltosio, utilizzata in alcune soluzioni per dialisi peritoneale (Extraneal Baxter) è in grado di interferire principalmente con strisce reattive contenenti deidrogenasi<sup>34</sup> e, quindi, fornire valori più elevati di glicemia. Va riconosciuto che tale interferenza ha un impatto clinico assai modesto, perché ristretto a pazienti diabetici in dialisi peritoneale, trattati con tali soluzioni e, tra questi, a coloro nei quali le concentrazioni di maltosio raggiungono livelli significativi. Infine, per quanto anch'essa di limitata portata clinica, non va ignorata l'interferenza dell'infusione di immunoglobuline nel paziente diabetico.

In questo contesto si vuole sottolineare che talune interferenze, proprio per la loro relativa rarità, possono essere sconosciute anche al personale curante, benché debba riconoscersi che sono correttamente segnalate dalle ditte produttrici. La conoscenza del principio di funzionamento e del tipo di reazione enzimatica utilizzata da un determinato glucometro, nonché delle possibili fonti di errore nella misura della glicemia, sono indicazioni molto utili a fornire le giuste raccomandazioni, sia ai pazienti sia ai medici curanti, nella scelta del dispositivo più adatto alla particolare situazione clinico-terapeutica. I medici, infatti, dovrebbero conoscere bene la popolazione di pazienti che seguono e le problematiche a

cui i propri pazienti possono essere esposti e di volta in volta scegliere il glucometro più adatto. Inoltre, il medico deve ricordarsi sempre di "trattare il paziente, fidandosi dei sintomi dello stesso e non dei valori del glucometro", in modo particolare quando essi sono troppo elevati o troppo bassi (si rimanda, a questo proposito, al caso clinico esposto in questo stesso fascicolo alla pagina 172).

In questo contesto, comunque, da parte delle ditte produttrici, è necessaria una maggiore attenzione sulla caratterizzazione dei glucometri attualmente in commercio. In particolare, dovrebbe essere riportato l'errore introdotto da ciascun possibile interferente, al valore di concentrazione analizzato, espresso in termini di concentrazione di glucosio (glicemia). Ciò permetterebbe al personale sanitario di scegliere in maniera attendibile il dispositivo più adatto alla situazione clinica da trattare, oltre a consentirgli una rapida stima dello scostamento del valore reale della glicemia da quello misurato dal glucometro e, quindi, una più cauta interpretazione dei risultati chimico-clinici.

## Bibliografia

1. Maser RE, Butler MA, DeCherney GS. *Use of arterial blood with bedside glucose reflectance meters in an intensive care unit: are they accurate?* Crit Care Med 1994;22:595-9.
2. Atkin SH, Dasmahapatra A, Jaker MA, Chorost MI, Reddy S. *Fingerstick glucose determination in shock.* Ann Intern Med 1991;114:1020-4.
3. Sylvain HF, Pokorny ME, English SM, Benson NH, Whitley TW, Ferenczy CJ et al. *Accuracy of fingerstick glucose values in shock patients.* Am J Crit Care 1995;4:44-8.
4. Walker EA, Paduano DJ, Shamoon H. *Quality assurance for blood glucose monitoring in health care facilities.* Diabetes Care 1991;14:1043-9.
5. Tang Z, Du X, Louie RF, Kost GJ. *Effects of drugs on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer.* Am J Clin Pathol 2000;113:75-86.
6. Bani Amer MM. *An accurate amperometric glucose sensor based glucometer with eliminated cross-sensitivity.* J Med Eng Technol 2002;26:208-13.
7. Cunningham A. *Introduction to bioanalytical sensors.* New York: Wiley 1998.
8. Ramsey G. *Commercial biosensors.* New York: Wiley 1998.
9. Kress-Rogers E. *Handbook of biosensors and electronic nose.* New York: CRC Press 1997.
10. Byfield MP, Abuknesha RA. *Biochemical aspects of biosensors.* Biosens Bioelectron 1994;9:373-400.
11. Sethi RS. *Transducer aspects of biosensors.* Biosens Bioelectron 1994;9:243-64.
12. Bartlett PN, Tebutt P, Whitaker RG. *Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry.* Prog Reaction Kinetics 1991;16:55-155.
13. Gorton L, Csoregi E, Dominguez E, Emneus J, Jonsson-Pettersson G, Marko-Varga G et al. *Selective detection in flow analyses based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes.* Anal Chim Acta 1991;250:203-48.

14. Foulds NC, Lowe CR. *Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers*. *Anal Chem* 1988;60:2473-8.
15. Schuhmann W, Ohara TJ, Schmidt HL, Heller A. *Electron-transfer between glucose oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface*. *J Am Chem Soc* 1991;113:1394-7.
16. Schuhmann W. *Electron-transfer pathways in amperometric biosensors: ferrocene-modified enzymes entrapped in conducting-polymer layers*. *Biosens Bioelectron* 1995;10:181-93.
17. Hale PD, Inagaki T, Karan HI, Okamoto Y, Skotheim TA. *A new class of amperometric biosensor incorporating a polymeric electron-transfer mediator*. *J Am Chem Soc* 1989;111:3482-4.
18. Degani Y, Heller A. *Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes*. *J Am Chem Soc* 1988;110:2615-20.
19. Gregg BA, Heller A. *Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications*. *Anal Chem* 1990;62:258-63.
20. Pishko MV, Michael AC, Heller A. *Amperometric glucose micro-electrodes prepared through immobilization of glucose oxidase in redox hydrogels*. *Anal Chem* 1991;63:2268-72.
21. Centonze D, Guerrieri A, Malitesta C, Palmisano F, Zambonin PG. *Interference-free glucose sensor based on glucose-oxidase immobilized in an overoxidized non-conducting polypyrrole film*. *Fresenius J Anal Chem* 1992;342:729-33.
22. Malitesta C, Palmisano F, Torsi L, Zambonin PG. *Glucose fast response amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film*. *Anal Chem* 1990;62:2735-40.
23. Palmisano F, Guerrieri A, Quinto M, Zambonin PG. *Electrosynthesized bilayer polymeric membrane for effective elimination of electroactive interferents in amperometric biosensors*. *Anal Chem* 1995;67:1005-9.
24. Palmisano F, Zambonin PG, Centonze D. *Amperometric biosensors based on electrosynthesized polymeric films*. *Fresenius J Anal Chem* 2000;366:586-601.
25. Ciriello R, Cataldi TRI, Centonze D, Guerrieri A. *Permelective behaviour of an electrosynthesized, non-conducting thin film of poly(2-naphthol) and its application to enzyme immobilization*. *Electroanalysis* 2001;12:825-30.
26. Palmisano F, Quinto M, Rizzi R, Zambonin PG. *Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor*. *Analyst* 2001;126:866-70.
27. Guerrieri A, De Benedetto GE, Palmisano F, Zambonin PG. *Electrosynthesized non-conducting polymers as permelective membranes in amperometric enzyme electrodes: a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer*. *Biosens Bioelectron* 1998;13:103-12.
28. Palmisano F, Centonze D, Quinto M, Zambonin PG. *A disposable, reagentless, third generation glucose biosensor based on overoxidised poly(pyrrole)-TTF:TCNQ composite*. *Anal Chem* 2002;74:5913-8.
29. Palmisano F, Centonze D, Quinto M, Zambonin PG. *A microdialysis fibre based sampler for flow injection analysis: determination of L-lactate in biofluids by an electrochemically synthesised bilayer membrane based biosensor*. *Biosens Bioelectron* 1996;11:419-25.
30. Newman JD, Turner APF. *Home blood glucose biosensors: a commercial perspective*. *Biosens Bioelectron* 2005;20:2435-53.
31. Turner APF, Karube I, Wilson GS. *Biosensor fundamental applications*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1987.
32. Smith LD, Budgen N, Bungard SJ, Danson MJ, Hough DW. *Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium Thermoplasma acidophilum*. *Biochem J* 1989;261:973-7.
33. <http://www.brenda.uni-koeln.de>
34. Drug Safety Information n. 13 – HAS (Health Sciences Authority) – <http://www.has.gov.sg>