

31 06 41



16 MAR

MEMORIA DESCRIPTIVA
de una Patente de Invención a nombre de:
C.F. BOEHRINGER & SOEHNE G.m.b.H., de na-
cionalidad alemana, domiciliada en MANN-
HEIM-WALDHOF (Alemania); por: "PROCEDI-
MIENTO PARA LA OBTENCION DE UN MEDIO DIAG-
NOSTICO PARA EL RECONOCIMIENTO DE LOS
CONSTITUYENTES DE SANGRE PURA".

-----ooo000ooo-----

El reconocimiento de los constituyentes en la sangre
pura ha representado hasta ahora un procedimiento muy compli-
cado, laborioso y que en su realización exige mucho tiempo,
el cual sólo puede llevarse a cabo en laboratorios debidamente
5 equipados y con personal especializado. Para ello, de la san-
gre pura hay que sacar primero el suero o plasma, donde luego
pueden determinarse las sustancias que interesan; de otro mo-
do, la propiedad fuertemente colorante de la hemoglobina alte-
raría todas las reacciones de color. Ultimamente se han descrito



también procedimientos, que de un modo simplificado permiten el reconocimiento de glucosa o urea en la sangre pura. El principio de estos nuevos procedimientos se basa en que una tira de papel indicador es recubierta por fuera con una película semi-permeable; si sobre una de estas tiras se echa sangre pura, el suero con los constituyentes pasa a través de la película semi-permeable y conduce a la reacción cromática en el papel, mientras que los glóbulos rojos quedan retenidos sobre la película. Después de cierto tiempo hay que quitar el coágulo de sangre para que se pueda ver en el papel el color de la reacción. Este procedimiento constituye indiscutiblemente una simplificación en comparación con los métodos de laboratorio apuntados más arriba, pero de todos modos adolece todavía de sensibles inconvenientes: para poder valorar la coloración de la reacción, los componentes rojos de la sangre tienen que quitarse con un trapo o lavándolos; si esto no se hace a la perfección, el resultado pueden ser diagnósticos erróneos. Pero también la fabricación de estas tiras indicadoras es relativamente complicada y costosa.

Una rápida determinación de las sustancias que contiene la sangre efectuada por personas inexpertas como método rápido de investigación en la cama del enfermo, con motivo de accidentes o como "screening test" en clínicas, es de gran importancia para muchas sustancias.



1. Glucosa: La determinación de la concentración de glucosa en sangre tiene mucha importancia en enfermos afectados de diabetes, por ejemplo en accidentes, cuando hay que ver rápidamente si se sufre un coma debido a hiperglicemia o hipoglicemia. Luego es también de interés la vigilancia del nivel de glucosa en sangre para prescribir los medicamentos correspondientes a un paciente. También en el descubrimiento de casos de diabetes latentes es importante un método sencillo y rápido para determinar la glucosa en sangre pura ("screening test").
2. Urea: El reconocimiento del contenido de urea en sangre es de importancia para la valoración de enfermedades nefríticas y para el descubrimiento de azotemias desconocidas.
3. Serocolinesterasa: para la valoración de varias enfermedades hepáticas, y también para casos de intoxicación por insecticidas agrícolas, se necesita un test sencillo para la prueba de la serocolinesterasa.
4. Fenilalanina: para poder determinar ya en los primeros días de vida de un lactante si existe una Oligophrenia phenylpyruvica, las casas de maternidad deberían disponer de un sencillo "screening test" para el contenido de fenilalanina en sangre. Hasta ahora se estaba supeditado al reconocimiento del ácido pirúvico en la orina - método éste que sólo da resultados seguros después de la 6ª semana de vida. La atención posterior a los lactantes es, sin embargo, sumamente



16

complicada; en esto también se pierde mucho tiempo, hasta el punto de que muchas veces no es ya posible aplicar a tiempo un tratamiento satisfactorio de esta enfermedad que produce la imbecilidad.

- 5 5. Galactosa: una importancia parecida tiene la averiguación a tiempo de lactantes que padecen galactosemia, mediante una determinación rápida de la galactosa en sangre.

Otras sustancias, cuya rápida determinación en la sangre es importante son, por ejemplo, fosfatasas, transaminasas, 10 dehidrogenasas, tripsina, histidina, ácido úrico.

Para el reconocimiento de glucosa en sangre se utiliza corrientemente la reacción cromática específica descrita por W. Franks y F. Lorenz [*Liebigs Annalen* 532, (1937), pág. 1 a 287]. Se trata ahí de la oxidación de glucosa a ácido glucónico, 15 la cual se lleva a cabo mediante oxígeno molecular en presencia de glucosaoxidasa y de un amortiguador a pH 5. El agua oxigenada que se libera oxida un indicador redox en presencia de peroxidasa. Como indicador pueden utilizarse p-fenilendiamina y las mezclas - conocidas por el nombre de reactivos "Nadi" - de fe- 20 noles y aminas aromáticas, en particular también sustancias de estructura de bencidina, por ejemplo la o-tolidina. En este reconocimiento de glucosa se obtiene una coloración azul más o menos intensa, correspondiente a la concentración en glucosa; por adición de colorantes amarillos pueden lograrse las correspon-



dientes tonalidades verdes. Si un cuerpo absorbente, por ejemplo papel filtro, se impregna con los citados reactivos, se obtiene un papel amarillo que es coloreado en un tono verde más o menos intenso por soluciones que contienen glucosa. Con un papel de esta clase se puede reconocer glucosa cualitativa y semi-cuantitativamente en líquidos poco coloreados, por ejemplo orina. Pero si se sumerge este papel en sangre o se le unta de sangre, se produce desde luego una decoloración dependiente del contenido de glucosa en la sangre. Sin embargo no se llega a reconocer claramente una coloración verde, y mucho menos una graduación en las intensidades de color; tampoco puede observarse ningún suficiente efecto de cromatografía por extensión del suero en el soporte absorbente.

Si en semejantes tests con sangre pura se intenta hacer una separación cromatográfica adicional de la sangre en el soporte indicador absorbente con medios coagulantes conocidos, y por consiguiente conseguir una fijación de los hematocitos perturbadores, no se obtiene entonces según nuestros diagnósticos con numerosas sustancias ningún resultado, o quizá alguno de todo punto insatisfactorio. Se han evidenciado como inservibles entre otros, : preparados de trombina, adrenocromo-monosemicarbazona, extractos de médula espinal, derivados de 2-metil-1,4-naftoquinona, acetato de uranilo, cloruro cálcico, gluconato cálcico. Tampoco han presentado efectos útiles o suficientes las sustancias macromoleculares: carrageenatos, pectinas, derivados



del ácido poligalacturónico, polímeros mixtos de vinilpirrolidona-vinilacetato, alcoholes polivinílicos, polietilenglicoles, poliacrilamidas, gelatinas, poliglicol 20 000.

Sorprendentemente se ha descubierto ahora que por
5 adición de aminoácidos o amidas de aminoácido, o sus sales, se obtienen papeles indicadores que al sumergirlos en sangre, dan por resultado una intensa separación de sustancia hemática roja y suero ligeramente coloreado, por lo que es bien reconocible la reacción cromática especial en la gama de humectación de
10 las porciones serosas. Como aminoácidos están particularmente indicados glicocola y alanina, y como amidas de aminoácido interesan, por ejemplo, glicinamida, asparagina, glutamina.

Si se sumerge en sangre, por ejemplo, un papel indicador de glucosa impregnado por adición de glicina, la parte sumergida de la tira de papel es coloreada por la sangre con una tonalidad pardo rojiza. Desde esta zona intensamente coloreada asciende entonces el líquido sin ninguna tonalidad propia especial; debido a la reacción de prueba de glucosa, esta segunda zona adquiere por la presencia de un colorante amarillo, una tonalidad más o menos verde en función de la concentración de glucosa en la sangre. Un efecto parecido se obtiene también transversalmente al papel cuando es humedecido con sangre por un lado: si el papel tiene suficiente espesor, la reacción cromática se observa entonces claramente por el revés.

25 Por la memoria impresa alemana 1.153.920 es conocido



un medio diagnóstico para la determinación de compuestos cetó-
nicos en líquidos corporales, que consiste en un soporte ab-
sorbente, impregnado de nitroprusiato sódico bajo adición de
ácido aminoacético. Este ácido se incorpora en este caso con
5 el fin de conseguir la necesaria sensibilidad a la reacción
cromática; (véase patente USA 2.509.140). En los medios diag-
nósticos sugeridos por el invento no es preciso semejante au-
mento de la sensibilidad; la adición de aminoácido se necesi-
ta aquí únicamente para separar los pigmentos hemáticos del
10 suero, al objeto de poder observar bien la reacción cromática.
Aparte de lo expuesto, el procedimiento de la memoria impre-
sa alemana 1.158.920 sólo está indicado para la determinación
de cuerpos cetónicos en líquidos prácticamente incoloros, ta-
les como la orina; en este test no se puede observar con éxito
15 la reacción cromática rojo-violeta, en sangre pura.

Para la preparación del medio diagnóstico según la
idea del presente invento, los soportes absorbentes, por ejem-
plo tiras de papel indicador, se impregnan como de costumbre
con los indicadores y reactivos específicos, donde a las solu-
20 ciones de impregnación se agrega 1 a 20 % en peso de un ami-
noácido o de una amida de aminoácido, o bien de sus sales. La
parte de la tira indicadora impregnada con el aminoácido, o
bien con la amida de aminoácido o sus sales, puede también se-
pararse debidamente de la zona colorante si la sangre pura,
25 de la que hay que hacer la prueba, se aplica a la parte que



contiene aminoácido y se deja que se difunda en la parte indicadora de color. La zona indicadora de color y la zona de precipitación pueden también dividirse en dos tiras indicadoras separadas pero que estan mutuamente en contacto.

5 Una forma de realización particularmente conveniente del medio diagnóstico sugerido por el invento se consigue precintando las tiras indicadoras en material transparente, conforme al modelo de utilidad aleman nº 1.852.316; las combinaciones de indicación que se obtienen de esta manera se observan perfectamente y sólo precisan una gota de sangre pura. Es muy ventajoso, como ha podido comprobarse, combinar la tira indicadora propiamente dicha con una segunda tira de papel más ancha que esté impregnada de una solución de aminoácidos, o de amidas de aminoácido o sus sales, y precintar luego ambas tiras de tal modo una sobre otra en una lámina de plástico, que la tira más ancha recubra uniformemente por fuera a la tira indicadora estrecha (véase-
10 figura). En este caso, la propia tira indicadora no necesita estar impregnada de aminoácido, de amida de aminoácido o de sus sales. Para la preparación de estas combinaciones indicadoras se
15 precintan las dos tiras de papel por un lado en una lámina continua y luego se corta esta lámina transversalmente, por ejemplo, en tiras de 5 mm de anchura. De esta manera se obtienen tiras de plástico en uno de cuyos extremos se encuentra una plaquita indicadora que es absorbente sólo por un lado; por el otro lado
20 cubierto por la lámina queda una plaquita indicadora cuadrada,
- 25



que por arriba y abajo aparece encerrada por una tira que destaca por el color (véase figura). Si se echa una gota de sangre sobre la parte absorbente de la tira, ésta se colorea entonces de rojo por la sangre, en cambio la propia plaquita indicadora no es influida para nada por el color de la sangre, y produce la reacción cromática específica de la sustancia que hay que reconocer en la sangre. Como quiera que la gota de sangre no entra directamente en contacto con la plaquita indicadora ni con los reactivos, la tira indicadora puede colocarse junto a la gota de sangre que sale del dedo o del lóbulo de la oreja. Así pues, esta forma de realización del medio diagnóstico sugerido por el invento ofrece el manejo más sencillo posible.

Como material transparente interesan sistemáticamente todos los materiales plásticos que son insolubles en agua, por ejemplo cloruro de polivinilo, éster del ácido politereftálico y soportes laminados con polietileno o láminas (por ejemplo lámina de ester del ácido politereftálico, lámina al acetato, polipropileno, superpoliamida). Es importante para la elección del plástico apropiado, sobre todo, su soldabilidad y precio ventajoso. De preferencia se emplean láminas de cloruro de polivinilo, pues se entregan con gran espesor y resultan rentables. El precintado se realiza, como de costumbre, por el procedimiento de impulso o de contacto térmico, o por alta frecuencia (véase modelo de utilidad alemán nº 1.852.316).

En los ejemplos siguientes se explica la fabricación



16 MAR

del medio diagnóstico sugerido por el invento.

EJEMPLO 1 : Fabricación de una tira indicadora apropiada para el reconocimiento de glucosa en sangre pura.

Solución de impregnación I:

5	Peroxidasa	0,012	g
	Glucosaoxidasa	1,3	g
	Tartracina	0,1	g
	Fosfato potásico prim.	0,269	g
	Fosfato sódico sec.	0,004	g
10	Glicocola	5,0	g
	Acetona	10,0	ml
	Agua destilada	ad. 100,0	ml

Solución de impregnación II:

	o-tolidina	0,42	g
15	acetona	ad. 100,0	ml

Con la solución de impregnación I y II se impregna sucesivamente papel filtro Schleicher & Schüll nº 2316, seco y cortado en tiras de 5 mm de ancho.

Si se sumerge una de estas tiras en una gota de sangre, por ejemplo en el dedo o lóbulo de la oreja, a unos 3 mm de profundidad, a través de la zona sumergida se humedece una zona casi de la misma anchura por un líquido libre de pigmento hemático rojo, que según sea el contenido en glucosa se vuelve más



16 MAR

o menos verde. De esta manera puede reconocerse claramente glucosa todavía en una concentración de menos de 25 mg %.

EJEMPLO 2 : Tira de prueba de glucosa, precintada en lámina de plástico.

5 El papel filtro Schleicher & Schüll nº 2316 se trata primero con la solución de impregnación I citada en el Ejemplo 1, en la que todavía falta la adición de glicocola. Seguidamente se impregna con la solución de impregnación II mencionada más arriba, se seca y se corta el papel en tiras de 5 mm de
10 ancho.

Otra partida de papel filtro Schleicher & Schüll nº 2316 se impregna con una solución de glicocola de la siguiente composición:

	Glicocola	5 g
15	Agua destilada	ad. 100 ml

y se corta en la deseada anchura de 9 mm.

Las tiras de papel de glicocola obtenidas de esta manera se colocan encima de las tiras de papel indicador de glucosa antes descritas, y sobre una lámina de cloruro de polivinilo precintable en caliente se pasan por dos rodillos, uno de
20 los cuales, o ambos, están dotados de calefacción. Por el contacto de calor, los papeles combinados se sueldan sobre la lámina. Esta se corta luego transversalmente en tiras de 5 mm de ancho, las cuales representan entonces las tiras indicadoras



terminadas (véase figura).

Si por el lugar absorbente se humedecen las tiras in-
 dicadoras con una gota de sangre, la plaquita indicadora cuadra-
 da amarilla se vuelve entonces, al cabo de unos 1 a 2 minutos,
 5 más o menos verde según sea el contenido de glucosa. El papel
 blanco impregnado de glicocola se colorea en un tono pardo roji-
 zo por el pigmento hemático. De este modo puede reconocerse cla-
 ramente glucosa, todavía en una concentración de menos de 25 mg %.

EJEMPLO 3: Preparación de una tira indicadora apropiada para el
 10 reconocimiento de serocolinesterasa en sangre pura.

Solución de impregnación I:

	Butirilcolinyoduro	5	g
	α -alanina	5	g
	Agua destilada	ad. 40	ml
15	Lejía de sosa 1 n (c.s. hasta pH 7,0)		
	Metanol	10	ml

Solución de impregnación II:

	Azul de bromotimol	0,35g
20	Metanol	ad. 50,0 ml

Un papel filtro (Schleicher & Schüll nº 2316) se tra-
 ta sucesivamente con las soluciones de impregnación I y II, y se
 le acaba de tratar de la misma manera que se describe en el ejem-
 plo 1.



La solución de impregnación para el papel separador de pigmentos hemáticos tiene la siguiente composición:

α -alanina	5 g
Agua destilada	ad. 100 ml

5 Impregnación en papel filtro Schleicher & Schüll n^o. 2316.

Las tiras de papel indicador de colinesterasa y las tiras de papel de alanina se precintan en una lámina y cortan con arreglo a lo expuesto en el ejemplo 2. Si las tiras indica-
10 doras obtenidas de esta manera se humedecen por el lugar absor- bente con una gota de sangre, la plaquita indicadora anaranjada toma primero un tono verde azulado, y acto seguido, más o menos rápidamente se vuelve otra vez anaranjada pasando por los más diversos matices de verde. La velocidad del cambio de color es
15 una medida de la actividad de la serocolinesterasa en la san- gre. Si después de determinado tiempo se compara el color re- sultante con la escala de colores, puede determinarse la acti- vidad: cuanto más clara se vuelve la plaquita indicadora tanto más alta es la actividad de la serocolinesterasa, y cuanto más
20 pequeño es el cambio de color después de la coloración verde azulada inicial, tanto menor es la actividad.

EJEMPLO 4: Preparación de una tira indicadora apropiada para el reconocimiento de galactosa en la sangre pura.

Solución de impregnación I:



16 MAR 1963

	Peroxidasa	0,012	g
	Galactosaoxidasa	0,3	g
	Fosfato potásico prim.	0,746	g
	Fosfato sódico sec.	2,585	g
5	Acetona	10,0	ml
	Agua destilada	ad 100,0	ml

Solución de impregnación II:

	o-tolidina	0,42	g
	Acetona	ad 100,0	ml

10 Un papel filtro (Schleicher & Schüll nº 2316) se impregna sucesivamente con las soluciones de impregnación I y II, se seca y se corta.

La solución de impregnación para el papel separador de pigmentos hemáticos tiene la siguiente composición:

15	Glicinamida clorhidrato	5	g
	Agua destilada	ad 100	ml

El papel filtro Schleicher & Schüll nº 2316 se impregna con esta solución.

20 Las tiras indicadoras de galactosa y las tiras de papel de glicinamida se precintan en láminas de plástico como se explica en el ejemplo 2, y se cortan. Si las tiras de papel obtenidas de esta manera se humedecen con una gota de sangre por el lugar absorbente, la plaquita indicadora cuadrada se colorea más o menos intensamente de azul, según sea el contenido

310841

- 15 -



de galactosa. El resto del papel se colorea de pardo rojizo por el pigmento hemático rojo. La galactosa puede reconocerse así todavía en una concentración de menos de 7,5 mg %.

EJEMPLO 5: Papeles indicadores de urea:

5 Sobre un papel filtro se aplica ureasa en mezcla con un amortiguador apropiado y un indicador pH. Estos papeles indicadores de urea pueden diferenciarse en el valor pH y en la capacidad del amortiguador, así como en la naturaleza del indicador. El viraje del indicador es específico para cantidades de urea completamente determinadas.

10

 Un test, que a concentraciones de urea por debajo de 50 mg % se colorea en amarillo-naranja, y a concentraciones por encima de 50 mg % en rojo, puede obtenerse mediante un amortiguador de fosfato 0,1 mol de pH 6,6 y rojo de fenol como indicador.

15

 Mediante un amortiguador de fosfato 0,2 mol de pH 6,6 y rojo de fenol como indicador, se obtiene un test que a concentraciones de urea por debajo de 100 mg % reacciona con una tonalidad amarillo-naranja y, por encima de 100 mg %, con una tonalidad roja.

20

 Mediante el uso de un amortiguador de fosfato 0,4 mol de pH 5,5 y rojo de fenol como indicador se obtiene un test que presenta una tonalidad amarilla-naranja en cantidades de urea de menos de 200 mg %, y que se colorea de rojo a cantidades mayores de urea.

25



Estos papeles indicadores de urea se transforman en tiras indicadoras por el método señalado en el ejemplo 2. en combinación con los papeles separadores de pigmentos hemáticos descritos en los ejemplos 2, 3 y 4. Si las tiras indicadoras
5 obtenidas se humedecen con una gota de sangre por el lugar absorbente, con el correspondiente contenido de urea tiene lugar un viraje de color del indicador en la plaquita indicadora cuadrada. Según sea la naturaleza del amortiguador, pueden fijarse cantidades de urea en diferentes gamas de concentración; por
10 ejemplo urea inferior a 50 mg %, por encima de 50 mg % pero por debajo de 100 mg %, por encima de 100 mg % pero menos de 200 mg %, más de 200 mg %.

EJEMPLO 6: Papeles indicadores de fenilalanina.

L-aminoácido oxidasa (de veneno de serpiente), peroxidasa y o-tolidina se aplican juntamente con un amortiguador
15 de fosfato 0,2 mol de pH 6,5 sobre un papel filtro. Un papel impregnado de este modo se transforma con un papel separador de pigmentos hemáticos, con arreglo a lo expuesto en el ejemplo 2, en tiras indicadoras. Si estas tiras son humedecidas con sangre
20 conteniendo L-fenilalanina, se obtiene una coloración azul de la plaquita indicadora. De esta manera en la primera semana de vida pueden determinarse ya los niños que padecen fenilcetonuria.



-----N O T A -----

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

5 1.- Procedimiento para la obtención de un medio diagnóstico para el reconocimiento de los constituyentes de sangre pura, consistente en un soporte absorbente que está impregnado de reactivos e indicadores específicos, caracterizado por una adición de aminoácidos o amidas de aminoácido o de sus sales, que tiene por resultado una separación de la sangre pura en glóbulos y suero prácticamente incoloro, por lo que la reacción
10 específica del test tiene lugar fuera de la zona coloreada de rojo.

15 2.-Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque los aminoácidos o amidas de aminoácido, o sus sales, se aplican sobre un soporte absorbente que está separado del soporte del indicador, pero en contacto con él.

20 3.-Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 y 2, caracterizado porque por un lado, el soporte del indicador está cubierto por el soporte absorbente que está impregnado de una solución de aminoácidos o amidas de aminoácido o de sus sales, mientras que por el otro lado queda cubierto por un material transparente, por el que se puede observar la reacción cromática del test.

4.-PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN MEDIO DIAGNOSTICO PARA EL RECONOCIMIENTO DE LOS CONSTITUYENTES DE SANGRE PURA.

310641

- 18 -



Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de dieciocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16 MAR. 1965

CARLOS FERNANDEZ ZANDELAS
P. P.

A large, stylized handwritten signature in black ink is written over the typed name and extends to the right.



316141

16 MAR

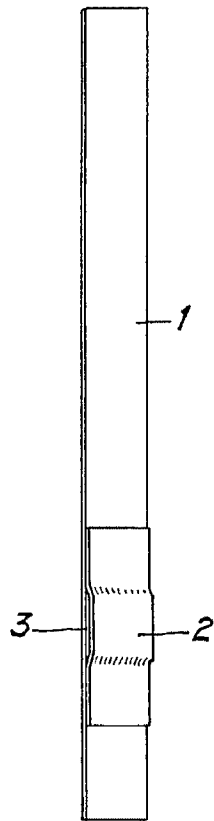


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

Madrid, 16 MAR, 1965

CARLOS FERNANDEZ GONZALEZ

ESCALA VARIABLE