

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19	ES	11	NUMERO	434.127	10	A 1
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	24-1-75		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	447.864		4-3-74		ESTADOS UNIDOS

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			G 01 N		

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACION DE CREATININA EN UNA MUESTRA DE UN HUMOR BIOLOGICO QUE CONTIENE PROTEINAS.

71 SOLICITANTE (S)

COULTER DIAGNOSTICS, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

740 West 83rd Street, HIALEAH, Florida 33014 Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)

ALVAR EDWIN JARVIS, de nacionalidad estadounidense, el cual ha cedido sus derechos a la entidad solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIEURU

1 se discuten muchos métodos conocidos para la determinación de la creatinina en los humores biológicos.

DESCRIPCION DE LA TECNICA ANTERIOR

5 La mayoría de los métodos actuales para la determinación de creatinina en el suero o en la orina se fundan en el desarrollo de un color rojo anaranjado formado por la interacción de un picrato alcalino y la creatinina, descrito por primera vez por M. Jaffe en 1886 y aplicado por Otto Folin a la determinación de la creatinina urinaria en 10 1904. Desde entonces, este método que utiliza la llamada "reacción de Jaffe" se ha convertido en el método más utilizado para el análisis de la creatinina.

15 La reacción de Jaffe no se considera específica de la creatinina en presencia de proteínas, glucosa y varias sustancias desconocidas presentes en el suero humano normal. Los métodos diseñados para aumentar la especificidad, en su mayor parte, se han fundado en el uso de filtrados exentos de proteína. Además de la utilización de filtrados exentos de proteínas, se han introducido los llamados "métodos específicos" para la creatinina, en los que el filtrado se 20 utiliza en técnicas de adsorción-elución; véase Brod, J. y Kotatko, J., J. Cas. Lek. Ces. 88, 665 - Excerpta Medica, Amst. 3, 477 (1950); Hare, R.S., Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 74, 148 (1950); Haugen, H.N. y Blegen, E.M., Scand. J. Clin. Invest. 5, 58 (1953); y Polar, E. y Metkoff, J., Clin. Chem. 25 11, 763 (1965). Los medios de adsorción más comunes utilizados han sido el silicato de aluminio hidratado y las resinas cambiadoras de ión.

30 Los problemas encontrados con las técnicas de adsorción-elución se centran alrededor de los complejos procesos

1 para efectuar la adsorción y la elución y el hecho de que
todavía no se ha eliminado por completo la falta de especificidad.

5 En otras técnicas "específicas" se han utilizado reactivos tales como sulfato cérico con filtrados exentos de proteínas para obtener la "destrucción de las sustancias interferentes". Véase Kostir, J.V. y Rabek, V., Biochim. Biophys. Acta 5, 210 (1950); Kostir, J.V. y Sonka, J., Biochim. Biophys. Acta 8, 86 (1952) y Uso de "bacterias destructoras de la creatinina" - Dubos, R. y Miller, V.F., J. Biol. Chem. 121, 427 (1937). En este último procedimiento, los filtrados exentos de proteínas del suero se dividen en dos partes alícuotas; una parte alícuota se trata con las "bacterias destructoras de la creatinina" y la otra parte alícuota se deja sin tratamiento. Las subsiguientes reacciones de Jaffe con ambas partes alícuotas dan diferentes lecturas de la absorbancia. Restando el valor de la parte alícuota "tratada con bacterias" de la "no tratada" se supone que se obtiene el valor de la "creatinina verdadera". Tampoco ha podido demostrarse satisfactoriamente la especificidad por este método. Más recientemente, se ha intentado desarrollar métodos que utilizan la reacción de Jaffe y evitan la desproteinización del suero, comprendidos dentro de dos categorías fundamentales. La primera implica el llamado "proceso cinético" que requiere una medida críticamente cronometrada de la velocidad de formación del color naranja rojizo de Jaffe, representado por Larsen, K., Clin. Chim. Acta 41, 209 (1972). Surgen problemas con la necesidad de unos espectrofotómetros para la medida cinética relativamente complicados y el uso de unos tiempos de desarrollo del color ex-

10

15

20

25

30

1 traordinariamente cortos (30-120 segundos). Los efectos de
la interferencia por sustancias distintas de la creatinina,
cromógenos que dan la reacción de Jaffe, no pueden ser total-
mente despreciados, como resulta del estudio de Raabo, E.
5 y Walloe-Hansen, P., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 297
(1972) y Heinegard, D. y Tiderstrom, G., Clin. Chim. Acta
43, 305 (1973).

10 La segunda vía de solución consiste en introducir la
supresión de los cromógenos distintos de la creatinina, posi-
tivos frente a la reacción de Jaffe, variando el pH de reac-
ción o incorporando reactivos en los que se ha demostrado
que suprimen el efecto de la interferencia de color por las
sustancias distintas de la creatinina. Constituyen una parte
15 integrante de todas estas soluciones los blancos reactivos
o los sueros corrientes a dos valores diferentes del pH, como
demuestran Raabo, E. y Walloe-Hansen, P., Scand. J. Clin.
Lab. Invest. 29, 297 (1972); Heinegard, D. y Tiderstrom, G.,
Clin. Chim. Acta 43, 305 (1973). Los métodos que se fundan
20 exclusivamente en la hipótesis de que efectuando reacciones
paralelas sobre el mismo suero, una a un pH más alto que la
otra, restando el valor al pH bajo del valor al pH más alto
y después utilizando "el factor 2,3" como corrección de la
interferencia de las proteínas, como indica Raabo, E. y
Walloe-Hansen, P., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 297
25 (1972), basados sobre un gran número de comparaciones con un
método específico previo descrito por Brod, J. y Sirota, J.
H., J. Clin. Invest. 27, 645 (1948), suscitan dudas sobre la
precisión principalmente a causa de este "factor 2,3" esta-
30 dísticamente observado y la confianza completa en la especi-
ficidad basada en las dos reacciones separadas dependientes

1 del pH.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Teniendo en cuenta los problemas de la técnica anterior antes indicados, la invención proporciona un procedimiento para detectar la creatinina que emplea un reactivo de picrato alcalino que utiliza fosfato sódico en lugar del hidróxido sódico o del hidróxido de litio más comúnmente empleados. Al reactivo de picrato alcalino se incorpora urea. También se añade al reactivo un detergente constituido por 10 un aralcanosulfato de sodio, potasio o litio, tal como dodecilsulfato sódico (laurilsulfato sódico) y borato sódico. En este procedimiento, la supresión de los cromógenos interferentes es máxima y se elimina el blanco de suero.

15 Se cree que, en presencia de urea, las moléculas de proteína cambian de configuración y se desdoblán como resultado de una desnaturalización suave. Este cambio de configuración aumenta la exposición de la molécula de proteína a la combinación con el dodecilsulfato sódico con la reducción resultante de la actividad del blanco. Los resultados de los 20 ensayos utilizando esta invención concuerdan bien con los métodos de referencia utilizando filtrados y técnicas de adsorción.

DESCRIPCION DE REALIZACIONES ESPECIFICAS

25 La siguiente descripción se da para permitir que los expertos en la técnica comprendan más claramente esta invención y la pongan en práctica. No debe ser considerada como limitativa del alcance de la invención sino que debe ser considerada como ilustrativa solamente.

30 Las formulaciones de reactivos son las siguientes:

- 1 A. Solución saturada de ácido pícrico - se añaden aproxima
damente 15 g a agua destilada templada hasta que ya no
se observa ninguna disolución adicional.
- 5 B. i. Solución de dodecilsulfato sódico - 4 g/100 ml.
ii. Borato sódico en fosfato sódico o potásico - solu
ción dibásica - 0,05 M de borato por cada 0,05 M de
fosfato.
iii. Solución de urea - 40 g/100 ml.

10 Para utilizar estas soluciones de reserva o prepara
das, se prepara una primera solución de trabajo constituida
por dos partes de la solución de urea al 40 % combinadas con
dos partes de la solución de dodecilsulfato sódico al 4 %.
Otra solución de trabajo posible preferida está constituida
por una parte de la solución de urea y tres partes de la so
lución de dodecilsulfato sódico. Después, se mezcla una par
te de dicha solución de dodecilsulfato sódico-urea con una
15 parte de la solución reguladora de borato-fosfato y se regu
la empleando hidróxido sódico a un pH de 12,4 aproximadamen
te. La segunda solución de trabajo comprende la solución sa
turada de ácido pícrico. Antes de su uso, se mezclan cuatro
partes de la primera solución de trabajo con una parte de la
solución saturada de ácido pícrico para formar un sólo reac
tivo alcalino de picrato.

20 En el procedimiento de determinación de la creatinina
utilizando esta invención, se han utilizado de 0,01 a 2,0 ml
de muestra con 0,2 a 25,0 ml de reactivo mixto final. Sin
embargo, es preferible emplear de 0,1 a 0,2 ml de muestra
con 4,0 ml de reactivo final. En este procedimiento preferi
do, se introduce 4,0 ml del reactivo alcalino de picrato
25 en un tubo de ensayo adecuado y se incuba previamente a 37°C

30

1 durante 3 a 5 minutos. Después se mezclan de 0,1 a 0,2 ml de
la muestra con el reactivo y se mantiene la incubación a
37°C durante 10 a 30 minutos. Preferiblemente, esta incuba-
ción se mantiene durante 15 minutos.

5 Después la solución incubada se introduce en un colo-
rímetro o espectrofotómetro frente a un blanco y se lee la
absorción de la luz del picrato de creatinina así formado a
490-535 nm. Preferiblemente, la lectura se realiza a 500 nm.
Después, se calcula el valor desconocido frente a un patrón
acuoso primario o un patrón a base de proteína secundario,
10 medido en combinación con la muestra desconocida, empleando
la siguiente fórmula:

$$(1) \text{ Valor desconocido} = \frac{\text{D.O. desconocido}}{\text{D.O. patrón}} \times \text{valor del patrón}$$

15 El ejemplo específico que acabamos de dar es suscep-
tible de diversas variaciones en ciertos aspectos dentro de
los parámetros de la invención. El reactivo de picrato alcali-
no puede ser regulado dentro de un intervalo de pH de 11,0
a 13,5 mezclando selectivamente la solución reguladora, por
ejemplo, el borato sódico con la solución de sulfato ya men-
20 cionada. También pueden tomarse medidas de la densidad óptica
dentro del intervalo de longitudes de onda establecido. Ade-
más, los expertos en la técnica pueden idear otras modifica-
ciones relativas a una formulación de material particular
para utilizar las enseñanzas esenciales de la invención. Por
ejemplo, otros detergentes que pueden utilizarse son: octil-
sulfato sódico, tetradecilsulfato sódico, heptadecilsulfato
sódico, cetilsulfato sódico, miristilsulfato sódico, octa-
25 decilsulfato sódico, oleilsulfato sódico, tridecilsulfato
sódico, laurilsulfato potásico y benzóulfato de dodecilo.

30

1 Las sales de potasio o litio análogas son igualmente útiles.
En general, el detergente puede caracterizarse como un aral-
canosulfato de sodio, potasio o litio.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:


REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento colorimétrico para la determina-
ción de creatinina en una muestra de un humor biológico que
contiene proteínas, cuyo procedimiento consiste en:

- 10 A. añadir un reactivo al fluido biológico que forma un com-
plejo coloreado, con una longitud de onda característica
de máxima absorción de la luz, con la creatinina contenida
en dicho humor, al mismo tiempo que se evita la interfe-
15 rencia de las proteínas con la determinación deseada me-
diante la formación de complejos de proteínas que impiden
la formación de cromógenos extraños de carácter no creati-
nínico;
- B. medir el grado de absorción de la luz a dicha longitud de
onda característica y
- 20 C. determinar la concentración de creatinina en dicho humor
por comparación del grado medido de absorción de la luz
con los valores de absorción de la luz obtenidos a partir
de soluciones acuosas patrón que contienen el reactivo y
unas concentraciones conocidas de creatinina.

25 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en
el que se agrega urea a la muestra antes de realizar las de-
terminaciones colorimétricas, en una cantidad suficiente pa-
ra formar los citados complejos de proteínas.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde
se añade un detergente a la urea y después la combinación se

 30

1

agrega a la muestra.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es octilsulfato sódico.

5

5. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es tetradecilsulfato sódico.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es heptadecilsulfato sódico.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es cetilsulfato sódico.

10

8. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es dodecilsulfato sódico.

9. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es miristilsulfato sódico.

15

10. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es octadecilsulfato sódico.

11. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es oleilsulfato sódico.

12. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es tridecilsulfato sódico.

20

13. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente seleccionado es dodecilbenzosulfato.

14. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el detergente está constituido por una solución de aralcanosulfato de sodio, potasio o litio.

25

15. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el tamaño de la muestra se mantiene entre 0,01 y 2,0 ml.

16. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el volumen de reactivo se mantiene entre 0,2 y 25,0 ml.

17. Un procedimiento según la Reivindicación 3, donde el pH se mantiene entre 11,0 y 13,5 durante la colorime-

~~30~~

1 tría.

18. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde se agrega un regulador al reactivo para mantener un pH comprendido entre 11,0 y 13,5 durante la colorimetría.

5 19. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO COLORIMETRICO PARA LA DETERMINACION DE CREATININA EN UNA MUESTRA DE UN HUMOR QUE CONTIENE PROTEINAS.

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de once páginas mecanografiadas.

Madrid 24 de enero de 1975
BERNARDO UNGERIA
P.P.

15

20

25

30

