

434869

CONCEDIDA

10 JUN. 1976

MEMORIA DESCRIPTIVA
de una Patente de Invención a nombre de:
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH., de nacionali-
dad alemana, domiciliada en 6800 Mannheim-
Waldhof, Sandhofer Strasse 112-132, (ALE-
MANIA); por: "PROCEDIMIENTO DE ANALISIS
PARA LA DETERMINACION POR VIA ENZIMATICA
DE SUBSTRATOS EN LIQUIDOS BIOLOGICOS".

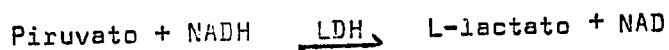
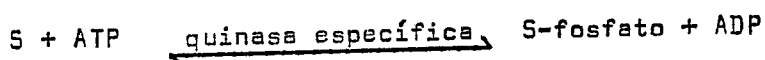
Int. Cl. G01N 31/14, 33/16

G01N 31/14, 33/16

El invento se refiere a un procedimiento de análisis para la determinación por vía enzimática de substratos - en líquidos biológicos, especialmente en líquidos corporales, tales como suero.

5

En la técnica analítica se determinan con frecuencia componentes en líquidos biológicos, de acuerdo con el siguiente esquema general de reacción:



10

En las ecuaciones antedichas, S significa el substrato que ha de ser determinado o un producto de reacción obtenido a partir del mismo por una reacción enzimática previamente realizada, ATP significa adenosintrifosfato, S-fosfato significa substrato fosforilado o producto de reacción fosforilado, -
5 ADP significa adenosindifosfato, PEP significa fosfoenolpiruvato, PK significa piruvatoquinasa, NADH significa nicotinamido-adenin-dinucleótido reducido, LDH significa lactato-deshidrogenasa y NAD significa nicotinamido-adenin-dinucleótido oxidado.

10 En la sucesión antedicha de reacciones, la cantidad del ADP formado en la primera reacción, es directamente proporcional a la cantidad desconocida de S. La magnitud de medición es el consumo de NADH, que es medido de una manera rutinaria - mediante determinación de la disminución de absorción a 340 nm, Hg 365 o Hg 335. El sistema antedicho de reacciones es utiliza-
15 ble de modo general para la determinación de sustancias que pueden ser fosforiladas bajo la influencia de una quinasa específica mediante ATP, con formación de ADP, o para la determinación de sustancias a partir de las cuales se pueden obtener -
20 productos de reacción adecuadamente fosforilables.

El esquema de reacción arriba representado es utilizado en especial en el laboratorio clínico-químico en gran extensión para la determinación de diferentes substratos, lográndose la especificidad para un determinado substrato, en cada -
25 caso, por medio de la quinasa específica. No obstante, el sistema tiene la desventaja de que en líquidos biológicos, tales como líquidos corporales y especialmente en el suero, existen

en general otras sustancias que también conducen a una reacción consumidora de NADH. Esto ocurre muy especialmente con el piruvato endógeno. Otra razón más para tomar en consideración un valor testigo de muestra es la diferente absorción inherente de los líquidos biológicos o corporales a las longitudes de onda mencionadas, por ejemplo a causa de su contenido de bilirrubina. Por lo tanto, tales determinaciones se han llevado a cabo hasta ahora en general tomando en consideración al mismo tiempo un valor testigo de muestra en el cual falta la quinasa específica, es decir la enzima fosforiladora. Por resta de los resultados obtenidos en las dos determinaciones paralelas, se puede determinar entonces el contenido de la sustancia buscada. Es desventajoso en tal caso el hecho de que se necesita doble cantidad de los reactivos enzimáticos, de por sí muy costosos, que lo que sería necesario para la determinación y, por consiguiente, se duplican prácticamente los costos de reactivos. Es desventajoso además el hecho de que la realización del procedimiento con los aparatos automáticos de análisis hoy día habituales es sólo posible cuando se dispone de dos canales de medición.

Otra posibilidad más de eliminar el error causado por sustancias endógenas consiste en hacer reaccionar las sustancias endógenas antes de añadir la quinasa específica, medir en una primera determinación el consumo de NADH, luego añadir la quinasa específica y determinar de nuevo el consumo de NADH. Este procedimiento es costoso y tiene la ventaja, especialmente grave, de que no se puede realizar apenas en

los aparatos automáticos de análisis conocidos.

Por lo tanto, el invento tiene la misión de proporcionar un procedimiento del tipo arriba mencionado, en el cual se deba realizar sólo una única medición y en el cual se disminuya el consumo de enzimas. Además de ello, el procedimiento debe de ser apropiado para la realización en aparatos automáticos de análisis habituales.

Esta misión se resuelve, de acuerdo con el invento, por medio de un procedimiento de análisis para la determinación por vía enzimática de substratos en líquidos biológicos, especialmente en el suero, por fosforilación del substrato o de un producto de reacción con ATP obtenido por vía enzimática a partir del mismo en presencia de una quinasa específica, con liberación de ADP, reacción de este último con fosfoenolpiruvato en presencia de piruvatoquinasa con formación de piruvato, hidrogenación del piruvato mediante NADH en presencia de lactatodeshidrogenasa y medición del consumo de NADH, el cual procedimiento está caracterizado porque la muestra de líquido es hecha reaccionar con los reactivos necesarios para la sucesión de reacciones en ausencia de la quinasa específica y en presencia de un sistema enzimático que regenera NADH, a continuación las enzimas son separadas desde la solución de reacción a través de una membrana semipermeable, se añaden al producto filtrado la quinasa específica, piruvatoquinasa y lactatodeshidrogenasa, y se lleva a cabo la medición.

El procedimiento de acuerdo con el invento es apropiado en principio para todos los procedimientos enzimáticos

de análisis, en los cuales o bien el substrato a determinar propiamente dicho o bien el producto de una reacción enzimática previamente realizada se hace reaccionar con ATP y con la quinasa específica correspondiente, con formación de ADP. Ejemplos de tales procedimientos son la determinación de glicerina libre (Klin. Wschr. 40, 362 (1962)), de grasas neutras (Klin. Wschr. 44, 262 (1966)), de creatinina (Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126 (1972)), de glucosa (Biochem. Z. 328, 499 (1957)).

Si se determina el substrato de la quinasa específica propiamente dicha, por ejemplo en el caso de la medición de glicerina libre, se añade sólo la quinasa específica para ello, en el caso del ejemplo, por lo tanto, glicerinoquinasa. Caso de que la quinasa fosforile a un producto de reacción obtenido por vía enzimática a partir del substrato propiamente dicho que ha de ser determinado, es necesario además el sistema de reacción enzimático para la recuperación del producto de reacción a partir del substrato en la primera etapa del procedimiento.

Un ejemplo de ello es la determinación de grasas neutras (determinación de triglicéridos), en que se hacen reaccionar las grasas con lipasa y eventualmente con esterasa, con formación de glicerina y ácidos grasos y la glicerina formada es fosforilada luego de nuevo con ATP y con glicerinoquinasa.

Los reactivos necesarios para la sucesión de reacciones son, aparte de las enzimas mencionadas, ATP, PEP y

NADH, también las sustancias auxiliares tales como sustancias tampón, sales inorgánicas por ejemplo sulfato de magnesio, eventualmente sustancias tensioactivas y similares. Todas estas sustancias son conocidas para un técnico en la materia dentro del marco de la sucesión de reacciones a realizar, y no necesitan ser descritas detalladamente en el presente caso.

El sistema enzimático regenerador de NADH consta en lo esencial de una deshidrogenasa específica para NADH así como de un sustrato para esta deshidrogenasa. Se prefiere dentro del marco del invento uno de tales sistemas que contenga alcohol deshidrogenasa y, en calidad de sustrato, alcohol. Otras deshidrogenasas específicas para NADH y otros sustratos para éstas pueden ser utilizados, no obstante, de igual modo.

Como membrana semipermeable se utiliza dentro del marco del invento una membrana que retiene sustancias proteínicas, pero deja pasar sustancias de bajo peso molecular. Ejemplos de membranas apropiadas de este tipo son membranas de diálisis, membranas de ultrafiltración, membranas para la ósmosis inversa, etc.

En el caso de la realización del procedimiento de acuerdo con el invento en un aparato automático de análisis usual en el comercio puede emplearse como membrana semipermeable para la separación de las proteínas el aparato de diálisis previsto en general en tales aparatos. Por lo tanto, es posible llevar a cabo el procedimiento según el invento en tales aparatos automáticos, sin tener que modificarlos y sin que sea necesario un segundo canal de medición. Por lo tanto,

en esta forma de realización del invento se hace uso, en principio, de una compartimentación de las reacciones, transcurriendo las reacciones enzimáticas, excluida la fosforilación con ATP (como consecuencia de la ausencia de la quinasa específica) en un primer compartimento, luego los componentes de bajo peso molecular son transferidos a través de la membrana semipermeable a un segundo compartimento, sin que sea necesario ningún tipo de mediciones, en el segundo compartimento se añaden luego la quinasa específica, PK y LDH, y se mide por vía fotométrica el consumo de NADH. Dado que por medio de la membrana semipermeable se excluye también el sistema regenerador de NADH como consecuencia de la separación de la deshidrogenasa necesaria para ello, el consumo medido de NADH corresponde sólo a la cantidad del sustrato fosforilado, excluyéndose las reacciones perturbadoras. La magnitud de las reacciones perturbadoras evitadas de este modo se hace reconocible en tal caso si se comparan por ejemplo para el suero las concentraciones de piruvato usuales en el mismo con las concentraciones que tienen normalmente en el suero las diferentes sustancias que han de ser determinadas de acuerdo con el procedimiento arriba descrito:

Componente del suero	Concentración margen normal (mM)	% del contenido del piruvato referido al sustrato
Piruvato	0,05 - 0,07	---
Triglicéridos	0,8 - 1,94	3 % hasta 10 %
Glicerina libre	0,03 - 0,145	30 % hasta 200 %
Creatinina	0,07 - 0,13	40 % hasta 100 %

La Tabla antedicha permite reconocer que sólo la perturbación causada por el piruvato puede constituir un múltiplo del valor de medición causado por el sustrato. A esto se agrega el hecho de que en los líquidos biológicos se presentan en muchos casos también otras sustancias perturbadoras, tales como bilirrubina, cuya influencia también es excluida en el procedimiento de acuerdo con el invento. Con el fin de mostrar esto, se disuelven en un suero cantidades crecientes de bilirrubina (hasta de 10 mg/100 ml). La determinación del contenido de glicerina con una de tales mezclas de reactivos dió iguales valores con bilirrubina que sin bilirrubina. En el caso de supresión del sistema regenerador de NADH resultaron valores de medición mayores en aproximadamente 10%, que se deben al contenido de piruvato endógeno, pero que, sorprendentemente, eran prácticamente independientes de la concentración de bilirrubina. Por lo tanto, por medio del procedimiento de acuerdo con el invento se excluyen también perturbaciones que han de ser atribuidas a una coloración inherente del líquido biológico. No es conocido a qué se debe este efecto.

Por medio de la eliminación de la necesidad de determinar un valor testigo de muestra, se disminuye hasta en 50% el consumo de enzimas caras y, al mismo tiempo, no sólo se conserva la posibilidad de realización automática del procedimiento sino que también se hace posible trabajar con los aparatos automáticos de análisis que sólo tienen un único canal de medición. En el caso de aparatos automáticos de análisis con dos canales de medición no sólo se mantiene libre un canal de me -

dición para otras determinaciones sino que también la manipulación se hace esencialmente más sencilla, ya que se ahorra el ajuste cronológico, electrónico y óptico de dos canales - automáticos de análisis.

5 De acuerdo con el invento se excluyen también perturbaciones debidas a un contenido de proteínas de elevado peso molecular, que dispersan intensamente la luz y de este modo simulan una absorción de luz, por ejemplo en el caso de sueros intensamente lipémicos.

10 Se lograron resultados especialmente buenos en el procedimiento de acuerdo con el invento con etanol y alcoholdehidrogenasa en calidad de sistema regenerador de NADH, cuando la concentración de etanol era de al menos 2 g/100 ml de tampón y la concentración de ADH era de al menos 180 UI/ml. En este caso se manifestó apropiado especialmente tampón de trietanolamina de 0,05 a 0,2 M, con pH 7 hasta 8. Los siguientes Ejemplos explican adicionalmente el invento.

EJEMPLO 1

20 Determinación de glicerina.

En la determinación se empleó una muestra acuosa, con una concentración de glicerina de 30 mg/100 ml. La influencia de piruvato se estudió añadiendo a la muestra 2, 4, 6, 8 y 10 mg de piruvato/100 ml. La determinación se llevó a cabo en el autoanalizador, Generación II, un aparato automático de análisis de la firma Technicon, USA. Este aparato trabaja con un sistema de circulación continua y, por lo tanto, las dosi-

5 ficaciones de los reactivos individuales se indican en la di-
 mensión (ml/minuto). Para la separación de las enzimas sirvió
 una celda de diálisis usual en el comercio de la firma Techni-
 con, USA. La muestra (0,05 ml/minuto) fue diluída con una so-
 lución que contenía tampón de trietanolamina, 0,1 M, pH = 7,6,
 NADH (0,025 mM), ATP (0,13 mM), PEP (0,04 mM), sulfato de mag-
 nesio (1,0 mM), etanol (2 g/100 ml) y las enzimas LDH (1,6 UI/
 ml), PK (0,3 UI/ml) así como ADH (180 UI/ml), con una veloci-
 dad de circulación de 0,8 ml/minuto. Se dializa frente a una
10 solución que contiene tampón de trietanolamina, 0,1 M, pH =7,6,
 con NADH (0,1 mM), ATP (0,53 mM), PEP (0,18 mM), sulfato de -
 magnesio (1,0 mM), LDH (6,4 UI/ml), PK (1 UI/ml) con una velo-
 cidad de circulación de 0,6 ml/minuto.

15 Al producto dializado se agrega la solución de la -
 glicerinoquinasa (2 UI/ml en 7,5 mM de sulfato de magnesio), -
 con una velocidad de circulación de 0,1 ml/minuto. Se mide la
 disminución de extinción, expresada en divisiones de escala, -
 después de un tiempo de incubación de 7,5 minutos a 37°C. En -
 la Tabla 1 se recopilan los resultados.

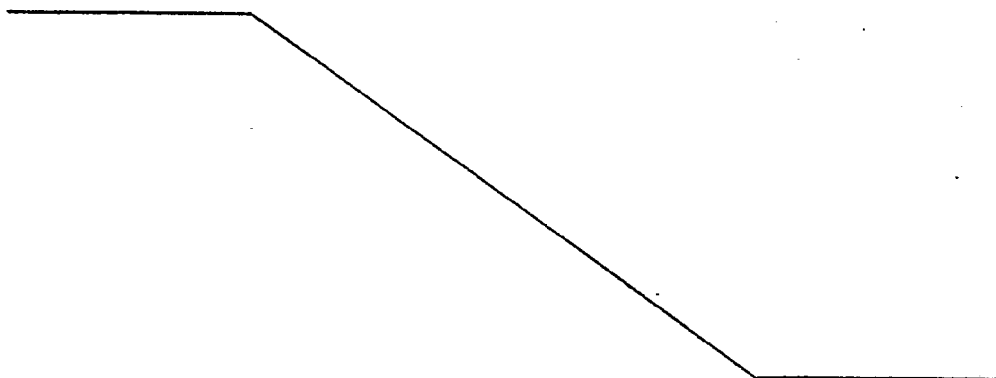


Tabla 1

Muestra	Aditivos pivato mg/100 ml.	Resultados encontrados					
		Columna 1 Con valor testigo de		Columna 2 Sin valor testigo de suero sin sistema regenerador de NADH		Columna 3 De acuerdo con el invento	
		Divisiones de escala	% de valor en contrato	Divisiones de la escala	%	Divisiones de la escala	%
Muestra 1	-	72	100	73	101	71,5	99,3
"	2	72	100	78	108	72	100
"	4	74	102,7	81,5	113	72,5	100,6
"	6	72,5	100,6	86	119	72,5	100,6
"	8	73	101	91,5	127	72	100
"	10	72	100	96,5	134	71	98,6

La muestra 1 contiene 30,0 mg de glicerina en 100 ml de agua bidestilada.

5 Resulta manifiesto que sólo el procedimiento de acuerdo con el invento (columna 3) proporciona con un único canal de medición valores coincidentes con relación al procedimiento de 2-canales, calificado como correcto, con valor testigo de muestra (columna 1).

EJEMPLO 2

Determinación de grasas neutras en el suero humano.

10 Como muestras se tomaron sueros humanos, a los cuales se había añadido piruvato en las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/100 ml. En lo que se refiere a los aparatos se trabajó igual a como se describe en el Ejemplo 1. Las soluciones tienen los siguientes componentes y se bombean con la siguiente velocidad de circulación:

Muestra: 0,05 ml/minuto.

15 Solución 1:

Tampón de trietanolamina 0,1 M, pH = 7,8 con 0,8 ml/minuto que contiene 0,025 mM de NADH, 0,13 mM de ATP, 0,04 mM de PEP, 1,0 mM de sulfato de magnesio, 2 g/100 ml de etanol, 1,6 UI de LDH/ml, 0,26 UI de PK/ml, 180 UI de ADH/ml, 11 UI de 20 esterasa/ml, 400 UI de lipasa/ml, 0,1 mg de dodecilsulfato sódico/ml.

Solución 2 (producto dializado):

25 Tampón de trietanolamina 0,1 M, pH = 7,6 con 0,6 ml/minuto que contiene; 0,1 mM de NADH, 0,53 mM de ATP, 0,18 mM de PEP, 1,0 mM de sulfato de magnesio, 6,4 UI de LDH/ml, 1,0 UI

de PK/ml.

Solución 3:

7,5 mM de sulfato de magnesio con 0,1 ml/minuto, que contiene 2 UI de glicerinoquinasa/ml.

5 El tiempo de incubación es de 7,5 minutos a 37°C.

Los valores de medición están recopilados en la Tabla 2.

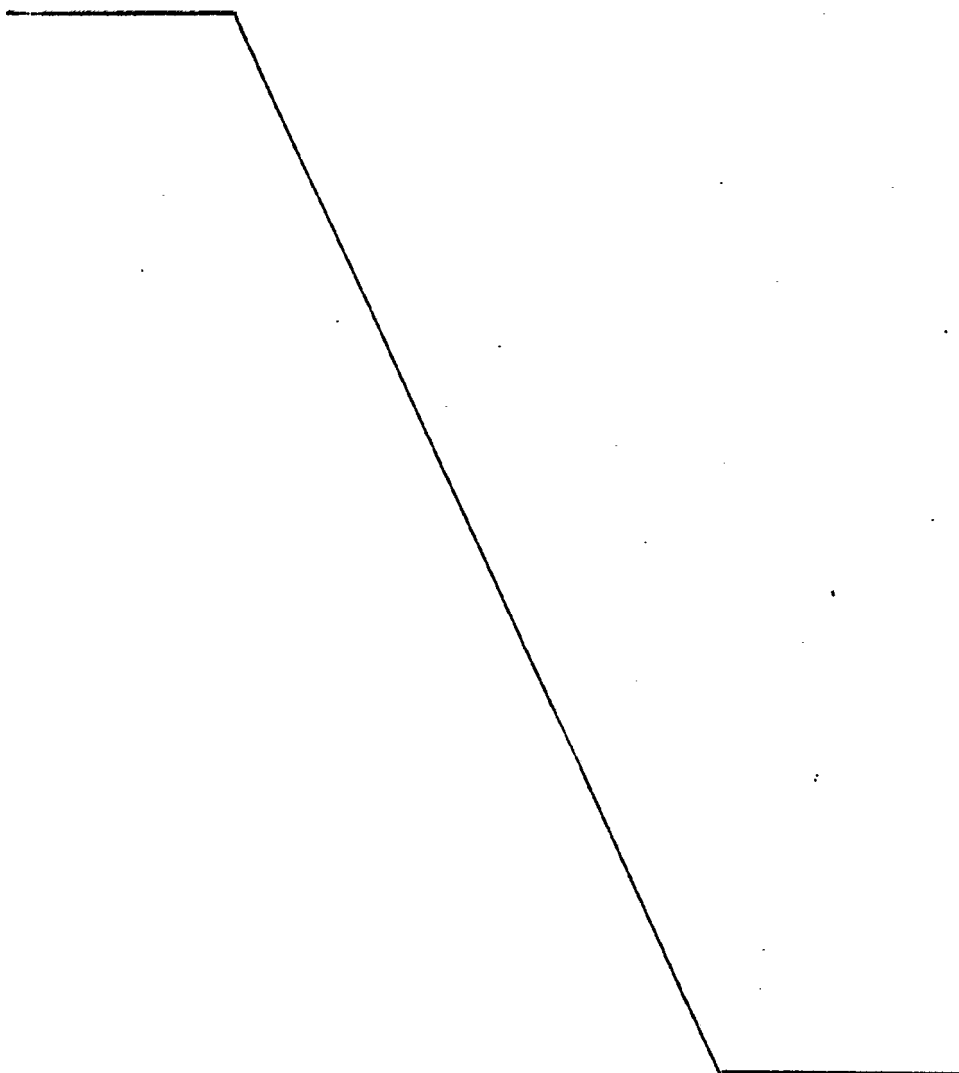


Tabla 2

Muestra	Aditivo Pi ruvato mg/100 ml	Columna 1 Con valor testigo de suero			Valores encontrados			Columna 2 Sin valor testigo de suero, sin sistema re- generador de NADH		Columna 3 De acuerdo con el in- vento	
		Divisio- nes de - escala	% de valor encontrado	Divisiones de escala	Divisiones de escala	%	Divisiones de escala	%	Divisiones de escala	%	
Muestra 1 = 138 mg de grasa neu- tra/100 ml de suero	-	29	100	31	106,8	29	100				
	2	29	100	35,5	122	29	100				
	4	29	100	39,5	136	29,5	102				
	6	28	97	44,5	153	29,0	100				
	8	28	97	49	168	29,0	100				
	10	28	97	53,5	184	29,0	100				
Muestra 2 = 114 mg de grasa neu- tra/100 ml de suero	-			21,5	113	19	100				
	2			25	131	19	100				
	4			28,5	150	19	100				
	6			32	168	19	100				
	8			36,5	192	19	100				
	10			40,5	213	19	100				

EJEMPLO 3

Supresión de interferencias de otras sustancias coloreadas.

5 Una muestra, en la que se debe determinar la concentración de grasas neutras, es mezclada con una muestra que contiene una elevada concentración de bilirrubina. (La bilirrubina es un producto de degradación del colorante sanguíneo propio del cuerpo y muestra a 340 ó 366 nm una absorción límite - cuyo máximo se encuentra en 450 nm). Por lo demás, se mantienen experimentalmente las mismas condiciones que en el Ejemplo 2 -
10 con la excepción de que para el testigo se midió en la serie de ensayos la columna 3 sin quinasa (glicerinoquinasa). Los resultados están mostrados en la Tabla 3.

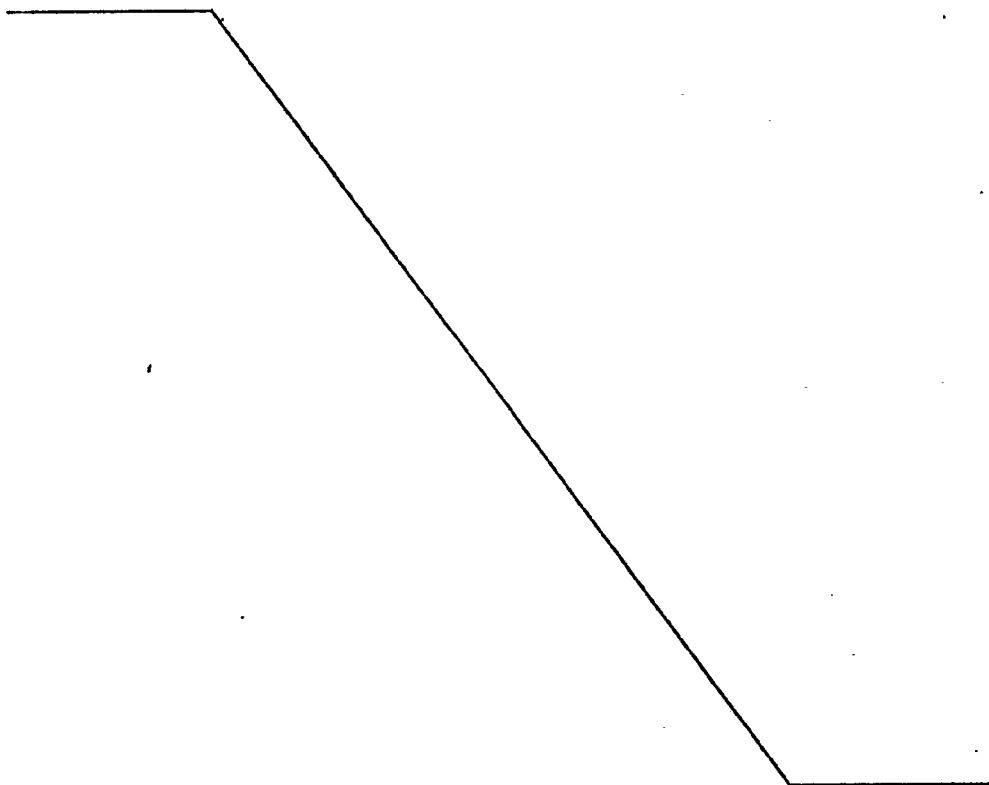


Tabla 3

Muestra	Aditivo bilirrubine (mg/100 ml)	Resultados encontrados					
		Columna 1		Columna 2		Columna 3	
		Divisio- nes de es- cala	Sin valor testigo de sue- ro con sistema regenera- dor de NADH (completo % de valor en contrado	Divisio- nes de es- cala	Sin valor testigo de suero sin quinasa (GK) y con sistema regene- rador de NADH %	Divisio- nes de es- cala	Igual que en el in- vento, pero sin qui- nasa (GK) %
Muestra 1	0	11	≈ 100	1 (*)	9	0	0
Muestra 2	0	18	≈ 100	1,7(*)	9,5	0	0
"	2	18	100	1,7(*)	9,5	0	0
"	5	18,5	102,7	1,7(*)	9,5	0	0
"	10	17,5	97,2	1,7(*)	9,5	0	0
Muestra 3	0	37,5	≈ 100	1,3(*)	3,5	0	0

*) Este valor representa piruvato endógeno.

El grado de valor encontrado de 0% en la columna 3 demuestra que no se puede medir ninguna influencia de bilirrubina.

N O T A

5 Se reivindica como nuevo y de propia invención.

1.- Procedimiento de análisis para la determinación por vía enzimática de substratos en líquidos biológicos, especialmente en el suero, por fosforilación del substrato o de un producto de reacción con ATP obtenido por vía enzimática a partir del mismo en presencia de una quinasa específica con liberación de ADP, reacción de esta última con fosfoenolpiruvato en presencia de piruvatoquinasa con formación de piruvato, hidrogenación del piruvato mediante NADH en presencia de lactatodeshidrogenasa y medición del consumo de NADH, caracterizado porque la muestra de líquido es hecha reaccionar, en ausencia de la quinasa específica y en presencia de un sistema enzimático regenerador de NADH, con los reactivos necesarios para la sucesión de reacciones, a continuación las enzimas son separadas de la solución de reacción a través de una membrana semipermeable, se añaden al producto filtrado la quinasa específica, piruvatoquinasa y lactatodeshidrogenasa, y se lleva a cabo la medición.

2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza un sistema regenerador de NADH, que contiene una deshidrogenasa específica para NADH y el substrato

to de la misma.

3.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza alcohol deshidrogenasa con alcohol en calidad de sustrato.

5 4.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo en un aparato automático de análisis.

5.- Procedimiento, según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque la separación de las enzimas se efectúa por diálisis, ultrafiltración, ósmosis inversa o centrifugación.

10 6.- "PROCEDIMIENTO DE ANALISIS PARA LA DETERMINACION POR VIA ENZIMATICA DE SUBSTRATOS EN LIQUIDOS BIOLOGICOS".

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

Madrid,

19 FEB. 1975

CARLOS FELIX DEL CANDELAS