

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

(10) ES	(11) NUMERO 442.507	(12) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 11-11-75	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
48714/74 48715/74	11-11-74 11-11-74	Gran Bretaña " "
(47) FECHA DE PUBLICIDAD 1	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(54) TITULO DE LA INVENCION "UN METCDO PARA LA DETECCION DE ACIDO URICO EN FLUIDOS"		
(71) SOLICITANTE (S) THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 183-193 Euston Road, Londres N.W.1., Inglaterra.		
(72) INVENTOR (ES) Douglas Esmond Faulkner.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ P.- 61.605		

442.507

POOR
QUALITY

La presente invención se refiere a composiciones químicas para ensayo, y en particular a tales composiciones aplicadas a tiras de ensayo que proporcionan una reacción de color visible, inversamente proporcional a la cantidad de material que interacciona con ellas. Una de tales composiciones, en particular, se puede usar para detectar la presencia de ácido úrico en fluidos.

Las tiras de ensayo en uso universal hoy día emplean técnicas colorimétricas directas que producen una cantidad de coloración proporcional a la concentración de material que se está determinando. Un ejemplo de tal tira de ensayo es la empleada en la determinación cuantitativa de glucosa en fluidos, donde la tira comprende un material absorbente impregnado con una mezcla de ensayo, en la que se incluye o-tolidina como indicador.

Cuando hay glucosa presente en la muestra de ensayo se produce una coloración azul cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucosa presente. Para determinar la concentración de glucosa se ha de hacer una determinación visual semicuantitativa del color producido, comparando la tira con un diagrama de color calibrado.

Los ensayos para detectar niveles de ácido úrico en fluidos del cuerpo, tal como suero u orina, en

uso común hoy día, no son del tipo de tira de ensayo; están basados en la reacción de ácido úrico, en solución alcalina, con ácido fosfowolfrámico, que produce un color o cromóforo azul. La intensidad del color azul así producido es proporcional a la concentración de ácido úrico en el fluido. Sin embargo, este tipo de ensayo padece de la sustancial desventaja de que todas las proteínas del suero han de ser precipitadas y eliminadas por una larga filtración o centrifugación, antes de la adición del reactivo, para evitar la formación de cromóforo por las propias proteínas, y también para evitar la formación de turbidez por interacción de tales proteínas con los reactivos usados. Tales manipulaciones preliminares consumen mucho tiempo, y además le falta especificidad al ensayo, dado que otras sustancias reductoras interfieren con algunos de los reactivos sugeridos para este fin.

Otros ensayos en uso emplean la enzima urica sa, que convierte el ácido úrico en alantoina y peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, en uno de tales ensayos, una muestra del fluido que contiene ácido úrico se trata con la enzima a pH de aproximadamente 8,5-9. Luego se hace reaccionar el peróxido de hidrógeno con un cromógeno, en presencia de la enzima peroxidasa, a pH 5, para dar un cromógeno oxidado con una coloración dife-

rente. La intensidad del color producido variará, de nuevo, proporcionalmente a la concentración de ácido úrico presente, y usualmente se compara con un diagrama calibrado. La desventaja de este y del último ensayo es que emplean el principio de la colorimetría directa, en el que los cambios de color a los niveles superiores de concentración de ácido úrico van disminuyendo, y por tanto el ojo humano experimenta gran dificultad para comparar los colores y determinar la cantidad exacta de ácido úrico. La falta de discriminación visual por el ojo humano hace que la determinación semicuantitativa sea inexacta, es decir, el error es usualmente de 66% a 200%. Aunque a bajas concentraciones la discriminación visual puede ser razonablemente exacta, a mayores concentraciones, es decir, cuando hay a menudo anomalías en sistemas biológicos, la discriminación se hace cada vez más difícil, y virtualmente imposible.

Se ha hallado recientemente que se produce una tira de ensayo extremadamente exacta incorporando una cantidad predeterminada de un indicador coloreado sobre un soporte sólido inerte, es decir, un indicador que responda al material objeto del ensayo de tal manera que pierda su color en proporción directa a la cantidad de material presente. Dado que el punto final es incoloro, el hecho de que la cantidad de material a ensayar esté

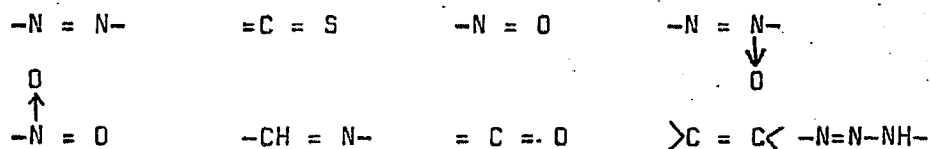
por encima o por debajo de un valor límite importante o seleccionado se puede determinar con mucha exactitud. El concepto de ensayo continuo se puede reemplazar por un sistema de medida precisa del punto final "crítico", que, desde luego, puede implicar el uso de un cierto número de tiras que permite la determinación de intervalos discretos.

Según un aspecto de la invención, se proporciona una composición de ensayo para determinar la presencia de un material en fluidos por debajo o por encima de una concentración límite seleccionada, que comprende una cantidad predeterminada de un indicador coloreado dispuesto sobre un soporte sólido inerte, respondiendo el indicador al material de tal manera que pierde su color en proporción directa a la cantidad de material presente, de manera que, por contacto con un volumen especificado del fluido de ensayo, el indicador se hace incoloro a una concentración previamente determinada del material.

Según la presente invención, en un segundo aspecto, se proporciona una composición de ensayo concreta para la detección de ácido úrico en fluidos bajo condiciones alcalinas, que comprende, en combinación, una cantidad previamente determinada de una fuente de yodo, un indicador de yodo y un solubilizador de yodo sobre un

soporte sólido e inerte, adaptada para que no dé reacción de color con una cantidad especificada o mayor de ácido úrico en el fluido a ensayar.

5 En colorimetría, los indicadores son generalmente compuestos químicos que son capaces de absorber preferentemente la luz a ciertas longitudes de onda, es decir, en la región visible del espectro, con el resultado de que aparecen coloreados. Esta capacidad está regida por la estructura del compuesto; por ejemplo, los
10 compuestos orgánicos que tienen agrupaciones cromóforas, es decir, grupos atómicos insaturados tales como



15 pueden ser coloreados. El anillo aromático de estructura quinonoide es también cromóforo. La presencia de cualquiera de los cuatro grupos primeros, o del anillo quinonoide, hace por sí misma coloreada a una sustancia, usualmente amarilla. Sin embargo, las sustancias con
20 grupos cetona necesitan dos de tales grupos próximos entre sí, y el doble enlace C = C ha de estar conjugado al menos seis veces para asegurar que la luz se absorba en la región visible del espectro.

25 La propiedad de un compuesto de ser coloreado se puede intensificar o modificar por la presencia de

otros grupos que por sí mismos no son cromóforos, tales como OH, NH₂, NHR o NR₂ (donde R = grupo alcohilo). La interacción de un compuesto coloreado con su entorno, es decir, por agregación, absorción sobre un sólido o disolución en diferentes disolventes, puede tener un fuerte efecto modificador sobre el color. Las relaciones estéricas también pueden alterar el color de un compuesto, de tal manera que en una forma pueda estar coloreado y en otra sea incoloro.

Además de moléculas orgánicas, también hay moléculas inorgánicas que son coloreadas, por ejemplo metales, particularmente los de transición, y ciertos no metales tal como los halógenos. De los metales, aquellos que tienen capas electrónicas 3d incompletas forman iones coloreados en solución.

Algunas moléculas inorgánicas, por sí mismas, por ejemplo el yodo, tienen solo un débil color; sin embargo, si forman complejo con otro compuesto, por lo demás no coloreado, el color se modifica o intensifica. El yodo, cuando está en forma del ión triyoduro complejo, se puede absorber sobre las macromoléculas coloidales de almidón, dando la bien conocida coloración azul intenso. La adición de un ión metálico a un compuesto por lo demás no coloreado puede dar también como resultado una sustancia coloreada.

En el caso de la composición de ensayo de ácido úrico, el indicador coloreado comprende una fuente de yodo y un indicador de yodo. La fuente de yodo usada puede ser una solución del propio yodo, o un complejo del mismo que sea estable en el almacenamiento, pero que desprenda yodo bajo las condiciones del ensayo. Sin embargo, si se usa el propio yodo, la solución debe estar recientemente preparada y ser usada inmediatamente para el ensayo, debido a que este material es volátil, y sus soluciones son por tanto inestables. Preferiblemente se usa una fuente compleja, es decir, un yodóforo, en la que el yodo se combina, por ejemplo, con un tensioactivo. La cantidad de fuente de yodo, respecto al soporte, dependerá del punto final requerido, es decir, del nivel de ácido úrico con el que desaparece el color.

Por ejemplo, si se espera de la composición de ensayo que indique de esta manera niveles de ácido úrico que sean mayores que los de varones adultos sanos, p.ej. 7 mg/100 ml, en plasma sanguíneo, la solución de yodo se puede ajustar entonces ventajosamente de manera que tenga 20,49 μg de yodo/cm² de soporte. El volumen de saturación del soporte es $2,46 \times 10^{-2}$ ml de composición de diagnóstico/cm². Evidentemente, se usan cantidades apropiadamente diferentes de los componentes de la composición para indicar el punto final de 6 mg/100 ml requerido para

mujeres sanas. Si se desea, también se pueden proporcionar otros puntos finales más altos, característicos de la severidad de la enfermedad que causa el nivel mayor de ácido úrico.

5 Un indicador de yodo fácilmente disponible es el almidón soluble, el cual, cuando forma complejo con el yodo libre proporcionado bajo las condiciones del ensayo, produce una coloración azul que bajo condiciones alcalinas disminuye luego por adición de ácido úrico.

10 Otros indicadores de yodo alternativos que también se pueden usar son la amilosa o amilopectina, ambos de los cuales son componentes del almidón, la dextrina, α -naftaflavona, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), glicógeno, glicolato de almidón sódico, u otros polisacáridos que den una reacción satisfactoria de color con

15 el yodo. La cantidad de almidón puede ser convenientemente de 0,5 a 2,5%, preferiblemente 1%, es decir, en exceso respecto a la cantidad total de yodo potencialmente disponible en la composición.

20 En otros casos, para que una sustancia coloreada sea útil como indicador ha de ser capaz de experimentar o tomar parte en una reacción, con el resultado de que el color se pierda o elimine. Los sistemas de doble enlace de los grupos cromóforos pueden ser eliminados

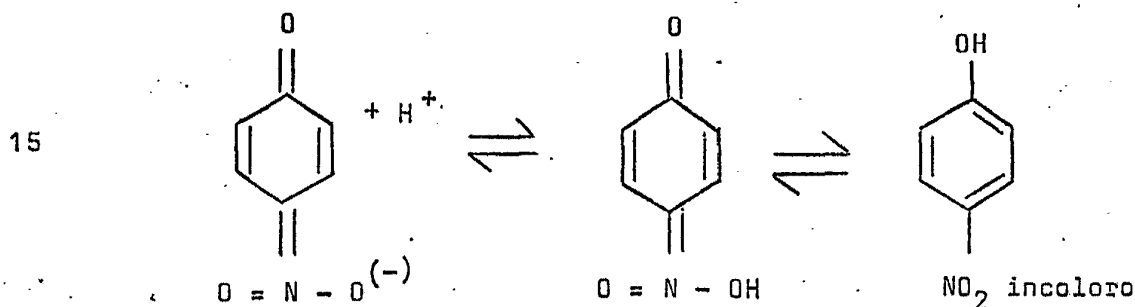
25 por reducción, produciendo así un compuesto completamente

saturado incoloro. Por ejemplo, el diazometano se puede reducir a la metil-hidrazina incolora.

5 Ciertos compuestos coloreados experimentan un cambio o pérdida irreversibles de color por oxidación, con formación de productos incoloros. Alternativamente, la pérdida de color puede tener lugar también cuando hay absorción o desprendimiento de un protón, como consecuencia de un cambio del estado de pH, acompañado por transposición tautómera de la molécula y destrucción del grupo cromóforo.

10

Un ejemplo de tal cambio de color viene dado por el p-nitrofenol.



Este principio se podría usar en muchas situaciones de ensayo en las que la cantidad de un metabolito ácido ha aumentado debido a un estado patológico.

Para obtener la reacción visible deseada, indicativa de una concentración concreta de una sustancia, esa sustancia sola, o en combinación con otros reaccio-

25

1
nantes, ha de ser capaz de reducir al indicador si aquel
contiene grupos cromóforos insaturados, o de oxidarle
irreversiblemente a un estado incoloro. Alternativamente,
la sustancia ha de ser capaz de dar o aceptar protones,
5 o de alterar las condiciones del pH, de manera que se in-
duzca una transposición en la estructura del indicador.

En ciertos casos se requieren reactivos adicio-
nales para favorecer el cambio de color. Por ejemplo, en
la composición para ensayo de ácido úrico se requiere un
10 solubilizador del yodo, tal como yoduro potásico, para
aumentar la solubilidad de la fuente de yodo por formula-
ción de iones triyoduro que son más solubles que las mo-
léculas de yodo. Se ha hallado que es suficiente para es-
te fin aproximadamente 9% de yoduro potásico, calculado
15 en base al yodo total disponible. Entre otros solubili-
zadores adecuados del yodo se pueden incluir otros yoduros
o tensioactivos.

Dado que el número de sustancias coloreadas co-
nocidas, adecuadas para uso como indicadores, es enorme,
20 es generalmente fácil, por tanto, hallar un indicador
que pueda interaccionar fácilmente con el material a en-
sayar. Esto puede implicar la determinación de pK, poten-
cial de oxidación-reducción, y propiedades similares, de
diversos grupos funcionales del material.

25 Otros factores que afectarán a la elección de

un indicador adecuado, aparte del tipo de reacción que pueda estar implicado, es que se disponga del mismo de forma fácil y barata en estado puro. De preferencia debe ser fácilmente soluble en sistemas acuosos u otros disolventes comunes, para facilitar la deposición sobre el soporte. Además, el indicador debe ser preferiblemente estable a la luz y al aire, y no se debe deteriorar por largo reposo. Además, no debe reaccionar con otros componentes o sustancias que se encuentren en el sistema de ensayo, formando así compuestos o complejos que interfieran con su acción.

El soporte sólido sobre el que se deposita la composición de diagnóstico de la invención debe ser inerte, y no reaccionar en forma alguna con los componentes de la composición. Se prefiere que la adhesión a la superficie solo tenga lugar con poca o ninguna penetración.

El tipo preferido de soporte es un filtro de fibra de vidrio de poca porosidad, tal como GF/C (Whatman) que tiene un peso de base de aproximadamente 55 g/m^2 , y una velocidad de difusión de agua de 3,0 cm de tira vertical de filtro/minuto, pero se pueden usar otros soportes inertes, tales como los preparados a partir de fibras de plástico inertes o similares. Debe ser capaz de absorber un cierto volumen constante de composición de ensayo en la retícula fibrosa.

Alternativamente, el soporte puede ser una película lisa no absorbente, pero el uso de este tipo tiene la desventaja de que el volumen de composición aplicado al mismo se ha de medir, para mantenerle constante y uniforme.

5

A su vez, el soporte puede estar unido a una hoja de respaldo impermeable, por ejemplo de policloruro de vinilo, para protegerle y evitar que se depositen sobre el mismo o penetren en él impurezas. Preferiblemente, el soporte sólido inerte, unido a la hoja de respaldo, se dispone en forma de tira de ensayo. La cantidad de composición de ensayo antes descrita, por unidad de área de soporte, depende del punto final requerido, del tipo de fluido a ensayar, y del volumen constante de fluido de ensayo que sature o se adhiera a la superficie de la tira.

10

15

Siempre que se hayan de ensayar fluidos que contengan partículas suspendidas, por ejemplo sangre, el soporte, con la composición de ensayo o diagnóstico depositada sobre él, se puede proteger y suplementar con, por ejemplo, una membrana semipermeable que puede estar compuesta, por ejemplo, por nitrocelulosa o materiales similares. Tal material permite que el líquido transparente pase a través del mismo, pero no los sólidos suspendidos, tal como las células de la sangre, que de lo contra

20

25

rio podrían hacer extremadamente difícil la lectura del punto final. Tal membrana "filtrante" se puede depositar, por ejemplo, por inmersión del soporte que ya lleva la composición de diagnóstico, y preferiblemente unido a una hoja de respaldo, en una solución del material formador de membrana en un disolvente volátil orgánico, y por sub-
siguiente secado.

Se pueden usar tiras adecuadas para el diagnóstico de la gota, en la que la cantidad de ácido úrico en la sangre es mayor que 6 mg/100 ml para las hembras, o 7 mg/100 ml para los varones. Bajo condiciones alcalinas, por ejemplo en presencia de bórax o álcali, el ácido úrico se oxida a alantoína; para indicar esta oxidación se puede usar un indicador de triyoduro y almidón. Con la oxidación del ácido úrico, los iones triyoduro se reducen a yodo, con la consiguiente pérdida de color. Por tanto, para ensayar a la gota se preparan tiras de ensayo que tienen una cantidad de indicador depositada sobre ellas equivalente a 6,5 mg/100 ml para las hembras, ó 7,5 mg/100 ml para los varones. Una vez determinado que el nivel de ácido úrico es igual o mayor que tales niveles, es útil emplear una serie de tiras que tienen puntos finales graduados por encima de 6,5 mg/100 ml, o de 7,5 mg/100 ml, para determinar con más exactitud el nivel de ácido úrico presente.

Por tanto, la muestra de orina o sangre se puede ajustar a un pH alcalino mayor que 9,0, preferiblemente 9,5, antes del ensayo, además de la posible eliminación de células, por ejemplo de la sangre, si es necesario.

5

Alternativamente, la composición de ensayo se puede mejorar más y suplementar disponiendo una capa semipermeable en la que se incorpora un agente alcalino en cantidad previamente determinada y en forma que se pueda disolver, de manera que cuando se aplica el fluido de ensayo a la tira de diagnóstico su pH se ajustará apropiadamente a alcalino mientras fluye por tal capa, antes de que llegue a la propia composición de diagnóstico. Se ha hallado que los carbonatos de metal alcalino, tal como carbonato sódico, particularmente en la forma micronizada, son muy convenientes para este fin. Por ejemplo, una suspensión de tal material en la composición de membrana, para dar una solución de más de $1,88 \times 10^{-2}$ M, preferiblemente $3,77 \times 10^{-2}$ M, ha sido preferida como capa semipermeable segunda y más exterior sobre la parte superior de la capa semipermeable protectora interior.

10

15

20

Para facilitar la lectura del punto final previamente determinado de la reacción que se está sometiendo a ensayo, es decir, cuando el indicador es incoloro, se puede suministrar un comparador. Tal comparador está.

25

compuesto de forma análoga a la composición principal de
ensayo para diagnóstico, en todos los sentidos excepto
en que no contiene nada, o contiene una cantidad menor,
del indicador, y por tanto puede mostrar claramente el
5 estado incoloro del soporte, y en el último caso la pre-
sencia del material a ensayar dentro de un intervalo de-
finido de concentraciones. Alternativamente, cuando hay
algún grado de enmascaramiento del color por el fluido
de ensayo, el efecto se anula por uso de un comparador,
10 y aún se puede leer el punto final. El comparador se si-
túa convenientemente adyacente al soporte de ensayo.

Cuando el fluido que se esté ensayando sea la
sangre, la lectura del punto final puede estar estorba-
da por la presencia de los glóbulos rojos de la sangre.
15 Estos se pueden eliminar, y usar en vez de aquella el
suero o plasma.

Alternativamente, los glóbulos rojos de la
sangre se pueden mantener eficazmente separados, y aclara-
rar de la superficie de la tira, incorporando una capa
20 semipermeable que no solo proteja a la composición, sino
que también actúe como filtro. Además de esto, se puede
añadir un anticoagulante tal como heparina a la sangre,
antes del uso, para evitar que los glóbulos rojos de la
sangre se sequen y coagulen sobre la tira, o alternati-
25 vamente la capa semipermeable más exterior, o su super-

ficie, se puede impregnar o revestir apropiadamente con tal anticoagulante.

5 El fluido a ensayar, p.ej. sangre, se aplica a cada banda de la tira de ensayo, se deja durante corto tiempo, por ejemplo 5 minutos, y luego se lava la tira bajo agua corriente y se examina. La banda de comparación del punto final no debe contener normalmente nada de coloración, pero la banda de ensayo puede conservar una coloración definida, lo que indica que la concentración de material, por ejemplo ácido úrico, es menor que 10 la apropiada para el punto final. Si el color se pierde, esto significará un contenido apropiado para o mayor que el que puede indicar al doctor condiciones patológicas, requiriendo por tanto más ensayos e investigaciones, proporcionando más muestras el paciente o individuo. 15

Por tanto, en un tercer aspecto de la invención se proporciona un método para determinar el mínimo o máximo nivel de un material, por ejemplo ácido úrico, en fluidos, que comprende aplicar una muestra de un fluido de ensayo a la composición de ensayo, según se ha definido antes, dejar que el fluido reaccione con la composición de ensayo, y observar la presencia o ausencia de una reacción de color. Usando una pluralidad de composiciones, que representan una serie de puntos finales, se podría determinar el nivel de ácido úrico para que cayera 20 se entre dos valores nítidos. 25

Por tanto, se puede producir un conjunto de en
sayo que comprenda una serie de tiras según la invención,
teniendo cada tira, sin embargo, una diferente cantidad
previamente determinada de indicador depositada sobre
5 ella. Por tanto, el resultado es una secuencia de tiras,
teniendo cada una un diferente punto final crítico en el
que el indicador se hará incoloro.

Las ventajas de esta composición de ensayo son
que es un sistema simple y barato, y fácil de producir.
10 Además, no se requiere equipo caro para el uso, y por
tanto se puede poner a disposición de todos los ejercien
tes en general. La lectura del resultado se facilita em-
pleando el principio de colorimetría inversa, y como re-
sultado no es necesario referirse a diagramas de color
15 calibrados, con las desventajas consiguientes de una de-
terminación semicuantitativa visual inexacta del color
producido. El resultado queda disponible muy rápidamente,
lo que se compara muy favorablemente con el largo tiempo
de ensayo, de más de una hora, con métodos anteriormente
20 descritos y usados.

A continuación se describirá la invención con
referencia a los siguientes ejemplos, pero no se ha de
considerar en absoluto limitada por los mismos.

25

Ejemplo 1 - Tira de ensayo para detectar ácido úrico

A Preparación de reactivos de ensayo

i) Fuente de yodo

El contenido de yodo de una preparación yodófora, Wescodyne (marca registrada), obtenida de Ciba Agrochemical, se determinó por titulación con tiosulfato sódico 1×10^{-2} N. El yodóforo se diluyó con agua, dando una solución $2,5 \times 10^{-3}$ N de yodo. El yodo a esta concentración, cuando se forma complejo con almidón y yoduro potásico, será equivalente a 7 mg de ácido úrico/100 ml, para una reacción en volumen equivalente.

ii) Solubilizador de yodo

Se preparó una solución al 9% de yoduro potásico en agua destilada.

iii) Indicador de yodo

Se suspendió almidón soluble (1 g) en agua destilada (90 ml) y se hirvió durante tres minutos, y luego se diluyó con agua destilada (10 ml), dando una preparación de almidón al 1%.

iv) Composición de ensayo

Se añadió un volumen (100 ml) del yodóforo Wescodyne (marca registrada) diluido a una parte alícuota (100 ml) de la solución de yoduro potásico al 9%, y la mezcla se agitó suavemente para evitar la formación de espuma. Se añadió a la mezcla una porción (100 ml)

del almidón soluble al 1%, y la composición así formada se agitó suavemente sin formación de espuma.

v) Composición de 1ª membrana

5 Se diluyó collodian (25 ml) (solución de neocol
collodian 301-261, que se puede obtener de British Drug
Houses) en éter dietílico (75 ml) (calidad anestésico
B.P.) y se mezcló a fondo. Se siguió diluyendo el collo
dian hasta 667, con una mezcla de éter dietílico y alco
hol étílico (9:1 en volumen, respectivamente).

10 vi) Composición de 2ª membrana que contiene un ajusta
dor del pH

15 Una mezcla (5 - 10 ml) de éter dietílico/alco
hol dietílico (9:1 en volumen, respectivamente) se aña
dió a carbonato sódico micronizado (800 mg) (calidad
analar anhidra), y la suspensión resultante se molió pa
ra dispersar todos los agregados grandes, y luego se
transfirió a un matraz con tapón, usando 200 ml del co
llodian diluido según se preparó antes en v). El matraz
se puso en una cabina ultrasónica, y se trató durante
20 un período suficiente para dispersar todos los agrega
dos.

B Preparación de tiras de ensayo

25 Una hoja de poli(cloruro de vinilo) (PCV) sin
plastificar (Fórmula 128/5065, que se puede obtener de
Bakelite Xylonite Ltd.) se cortó en un rectángulo (100
x 54 mm), y un área (10 mm de anchura) a lo largo de un

lado mayor del rectángulo se hizo áspera usando tela de esmeril de calidad gruesa.

5 Se cortó una tira (140 - 150 mm de longitud por 5 mm de anchura) de filtro de fibra de vidrio (GF/C Whatman, que se puede obtener de Scientific Supplies Co. Ltd.). Se untó adhesivo (nitrato de celulosa Britfix, que se puede obtener de Humbrol Ltd.) sobre el lado de la tira de fibra de vidrio opuesto al lado con el granu
10 lado tipo malla, y también sobre una tira de 5 mm de anchura) de la superficie hecha áspera del rectángulo de PCV. Luego se puso la tira de fibra de vidrio en contacto con la superficie cubierta de adhesivo de la hoja de respaldo.

15 Se añadió la composición de ensayo suficiente, preparada como en A i) a iv), a un recipiente poco profundo, para dar una profundidad de aproximadamente 6 mm. La tira de fibra de vidrio, unida al rectángulo de PCV, se sumergió en el reactivo durante 5 segundos, se retiró, y un borde de la tira se puso en contacto con una hoja
20 de papel de filtro, para eliminar el fluido residual. Se suspendió la tira al aire durante 2 minutos, y el fluido residual se eliminó usando papel de filtro.

Ejemplo 2

25 Se preparó una tira para diagnóstico como en el Ejemplo 1. Se añadió suficiente composición de 1ª mem

brana, según se preparó en el Ejemplo A (v), a un recipiente poco profundo, hasta una profundidad de 6 mm, y la tira de diagnóstico se sumergió allí. La tira se secó al aire, en una caja o recipiente a prueba de luz, estando plana la hoja de respaldo de PCV.

5

Ejemplo 3 - Preparación de un comparador

Se cortó una tira de 5 mm de filtro de fibra de vidrio (140 - 150 mm de longitud). Se preparó composición de ensayo como en el Ejemplo 1 A (i) a (iv), excepto en que se redujo la concentración de la fuente de yodo yodófora, para dar una concentración de yodo de $7,1 \times 10^{-4} \text{ N}$ (equivalente a 2 mg de ácido úrico/100 ml), y se puso en un recipiente poco profundo.

10

La tira de comparación se sumergió en el reactivo, se retiró, se secó y se unió, usando adhesivo, al respaldo de PCV adyacente a la primera tira de filtro, según se preparó en el Ejemplo 1.

15

Ejemplo 4

Se preparó una tira de comparación como en el Ejemplo 3, excepto en que antes de la unión a la hoja de respaldo se sumergió la tira en la composición de 1ª membrana, según se preparó en el Ejemplo 1 A (v).

20

Ejemplo 5

Se preparó una hoja de ensayo de filtro de fibra de vidrio, como en el Ejemplo 3 o Ejemplo 4, y luego

25

se cortó en tiras de ensayo de 5 mm de anchura y 50 mm de longitud, paralelas al eje menor de la hoja.

Ejemplo 6

5 Se prepararon tiras de ensayo como en los Ejemplos 2, 4 y 5. Se añadió suficiente composición de 2ª membrana, según se preparó en el Ejemplo 1 A. (vi), a un recipiente poco profundo, y se sumergieron en éste las tiras de ensayo. Luego se secaron en la oscuridad.

Ejemplo 7

10 Se tomó una muestra compuesta de 24 horas, de orina, de un paciente del que se sospechaba que padecía gota, y se ajustó el valor del pH a un valor de 9,0 usando carbonato sódico sólido. La muestra alcalina se diluyó a 1 en 7 con agua destilada, y luego se añadió
15 una gota a cada una de las tiras, de comparación y de diagnóstico, según se prepararon en el Ejemplo 1, 3 y 5, y se dejaron. Tras aproximadamente 5 minutos se examinaron las tiras para determinar cualquier color azul, y se halló que tanto la tira de comparación como la de diagnóstico
20 no tenían coloración, lo que indica que el nivel de ácido úrico era equivalente a o mayor que el de la fuente de yodo, y por tanto resultó que el paciente tenía un nivel anormalmente alto de ácido úrico en la orina, y se requerirían más ensayos de diagnóstico.

25

Ejemplo 8

Se siguió el mismo método usado en el Ejemplo 7, excepto en que el fluido de ensayo usado era sangre que no había sido diluída, sino que había sido tratada previamente, además, con heparina sólida (50 unidades/ml de sangre), y la tira usada se preparó como en el Ejemplo 2, 4 y 5. Además, antes de examinar las tiras para determinar la coloración, se lavaron bajo agua corriente para eliminar los glóbulos rojos de la sangre.

El resultado fue similar al del Ejemplo 7.

Ejemplo 9

Se siguió el método de ensayo según se usó en el Ejemplo 8, excepto en que el pH de la sangre no se ajustó antes de ensayar, y la tira de ensayo usada se preparó en el Ejemplo 6. Se obtuvo un resultado similar al observado en el Ejemplo 7.

20

25

REIVINDICACIONES.

5

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un método para la detección de ácido úrico en flúidos por encima o por debajo de un límite de concentración seleccionado, en condiciones alcalinas, comprendiendo el método aplicar una muestra de un flúido de en
15 sayo a un dispositivo de ensayo que comprende en combinación una cantidad predeterminada de fuente de yodo, un indicador de yodo y un solubilizador de yodo sobre un -
soporte sólido e inerte, seleccionándose la cantidad de fuente de yodo e indicador de yodo de modo que al reaccionar con un volumen de fluido de ensayo suficiente pa
20 ra saturar el soporte, tiene lugar una pérdida completa del color del indicador a la concentración seleccionada de ácido úrico, o a una concentración superior y un color residual es detectable por debajo de tal concentración.

25 2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el -

que la fuente de yodo en el dispositivo de ensayo es yodo.

5 3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que la fuente de yodo en el dispositivo de ensayo es una compleja.

4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el que la fuente de yodo compleja es yodóforo.

10 5ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que la concentración del preparado de fuente de yodo está comprendida entre $2,0 \times 10^{-3} N$ a $2,7 \times 10^{-3} N$ de yodo.

15 6ª.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que el indicador de yodo del dispositivo de ensayo es almidón soluble, amilosa, amilopectina, dextrina, alfa-naftaflavona, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, glicógeno, glicolato de almidón sódico u otros polisacáridos que dan una reacción de color satisfactoria con el yodo.

20 7ª.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el solubilizador de yodo en el dispositivo de ensayo es un yoduro.

8ª.- Un método según la reivindicación 7ª, en el que el yoduro es yoduro de potasio.

25 9ª.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, en el que la concentración de prepa

rado solubilizador de yodo es de 6 a 12% en peso.

10a.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1a a 9a, en el que el soporte del dispositivo de ensayo es un filtro de fibra de vidrio.

5 11a.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1a a 9a, en el que el soporte del dispositivo es un papel de filtro inerte.

12a.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1a a 11a, en el que el soporte está unido a una hoja de respaldo impermeable.

13a.- Un método según la reivindicación 12a, en el que la hoja de respaldo es de poli(cloruro de vinilo).

14a.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1a a 13a, en el que el dispositivo de ensayo está protegido por al menos una membrana semipermeable.

15 15a.- Un método según la reivindicación 14a, en el que la membrana semipermeable es de nitrocelulosa.

16a.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 14a ó 15a, en el que un agente alcalino está incorporado en la membrana semipermeable.

17a.- Un método según la reivindicación 16a, en el que el agente alcalino es un carbonato de metal alcalino.

18a.- Un método según la reivindicación 17a, en el que la concentración del preparado del metal alcalino -

1 es de $1,88 \times 10^{-2} \text{ M}$ a $4,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ basado en el fluido que
ha de ensayarse.

5 19ª.- Un método según la reivindicación 12ª, en el
que un comparador para comparación de color está también
unido al respaldo impermeable.

10 20ª.- Un método según la reivindicación 19ª, en el
que el comparador es de la misma composición que el dis-
positivo de ensayo que se ha definido en la reivindica-
ción 1ª en todos los aspectos excepto en que no contie-
ne fuente de yodo, o está presente una pequeña cantidad
de fuente de yodo distinta en dicho dispositivo de ensa-
yo.

21ª.- UN METODO PARA LA DETECCION DE ACIDO URICO
EN FLUIDOS.

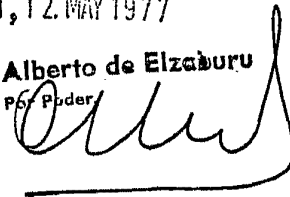
15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antece-
de, y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas a
máquina por una sola cara.

Madrid, 12. MAY 1977

20

P.A. Alberto de Elzaburu
Por Poder



25