

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 113 310**

② Número de solicitud: 9600572

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/52
G01N 33/84

⑫

SOLICITUD DE ADICION A LA PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **08.03.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.98**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.98

① Número de solicitud de la patente principal:
9401455

⑦ Solicitante/s: **Universidad de las Islas Baleares
Ctra. de Valldemosa, Km. 7,5
07071 Palma de Mallorca, Baleares, ES**

⑧ Inventor/es: **Grases Freixedas, Feliciano;
Costa Bauza, Antonia;
García Ferragut, Laura y
March Isern, Juan Gabriel**

④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos y su correspondiente kit.**

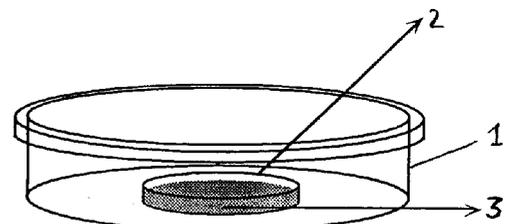
⑦ Resumen:
Procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos y su correspondiente kit.

El procedimiento comprende: a) verter la orina recién emitida en una placa contenedora provista de un sustrato de reacción y dejarla en reposo durante: (i) 12h a temperatura ambiente; o (ii) 24h a temperatura ambiente; b) desechar el contenido de la placa y lavar con agua bidestilada; c) dispensar el sustrato HCl diluido, acetato sódico acuoso y una solución indicadora de arsenazo III y evaluar la reacción coloreada que se produce.

El kit comprende una placa contenedora (1) conteniendo timol como esterilizante provista de una tapadera y en cuyo interior se encuentra un pocillo (2) conteniendo el sustrato de reacción (3).

Aplicación en medicina para evaluar la capacidad de una orina para formar cálculos renales cálcicos.

FIGURA 1



ES 2 113 310 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos y su correspondiente kit.

Campo técnico de la invención

La presente invención se inserta en el campo del estudio del riesgo de la litiasis renal cálcica, concretándose en el desarrollo de un sistema tipo kit que permite evaluar la capacidad de formación de cristales cálcicos en una muestra de orina de cualquier individuo.

Estado de la técnica anterior a la invención

La formación de cálculos renales, como es sabido, obedece prácticamente en todos los casos a la desafortunada combinación de varios factores. Estos factores pueden clasificarse en dos grandes grupos: I) factores inherentes a la composición de la orina. II) factores relacionados con la morfoanatomía renal.

La orina es un medio metaestable en el que normalmente coexisten diversas sustancias que pueden cristalizar formando cálculos (sustancias que se encuentran en estado de sobresaturación). El que estas sustancias cristalicen depende del grado de sobresaturación, de la presencia de sustancias promotoras (nucleantes heterogéneos) y de la presencia de inhibidores de la cristalización.

La presencia de cavidades con baja eficacia urodinámica y que, por tanto mantienen retenida la orina durante tiempos prolongados, y las alteraciones del epitelio que recubre la papila renal (capa de glicosaminoglicanos reducida o eliminada, necrosis...) son factores ligados a la estructura renal que favorecen la formación de cálculos renales.

Normalmente, es necesaria la existencia de factores pertenecientes a ambos grupos para que se generen cálculos renales. El test que se presenta permite evaluar precisamente de forma muy simple la capacidad que posee una orina determinada para cristalizar sales cálcicas, de tal manera que la orina de un individuo sano no daría lugar al crecimiento de cristales de sales cálcicas, mientras que la orina con tendencia a la formación de cálculos renales (muy sobresaturada y/o con importante déficit de inhibición y/o abundantes nucleantes heterogéneos) generaría cristales de sales cálcicas.

Como referencias bibliográficas estrechamente relacionadas con el objeto de la presente invención pueden mencionarse las siguientes: J.M. Baumann. How reliable are the measurements of crystallization conditions in urine?. Urol. Res. 16, 133-135 (1988); J.M. Baumann. How to measure crystallization conditions in urine: A comparison of 7 methods. Report from a workshop held on November 28, 1987 in Basle. Urol. Res 16, 137-142 (1988); F. Grases, O. Söhnel. Mechanism of oxalocalcic renal calculi generation, Int. Urol. Nephrol. 25,209-214 (1993); F. Grases, A. Costa-Bauzá, J.G. March, O. Söhnel, Artificial simulation of renal stone formation. Influence of some urinary components. Nephron 65, 77-81 (1993); F. Grases, A. CostaBauzá, J.G. March. Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. Brit. J. Urol. 74, 298-301 (1994).

En la solicitud de patente principal N° 9401455

se proponía un método para la determinación de la capacidad inhibidora de la cristalización en muestras de orina humana y su correspondiente kit.

El referido método comprende esencialmente las siguientes operaciones:

(a) introducir la muestra de orina en un contenedor que incluye un sustrato o superficie sólida plana iniciadora de la cristalización, a 37°C durante 56 horas aproximadamente; (b) retirar el sustrato conteniendo los cristales y disolverlos en medio ácido; (c) evaluar la cantidad de calcio contenida en dichos cristales.

El kit empleado para llevar a cabo este método comprende (1) un pequeño recipiente contenedor de un sustrato (2); (3) un contenedor de la orina a analizar; (4) un contenedor donde se encuentra introducido el otro contenedor (1); (5) un recipiente, tipo tubo de ensayo, en el que se produce la disolución de los cristales depositados en el sustrato (2).

El solicitante ha continuado investigando sobre este método y este kit, consiguiendo perfeccionar ambos, para llegar a conseguir un kit de fácil distribución industrial y empleo simplificado por parte del propio usuario en su domicilio, frente a la necesidad de llevar a cabo el análisis en laboratorios especializados.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a un procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos y a su correspondiente kit.

Cuando una superficie no protegida y no renovada entra en contacto con una orina, más tarde o más temprano acaban cristalizando sobre ella aquellas sustancias que se encuentran sobresaturadas y cuya inhibición es más deficitaria. La facilidad con la que se produce esta cristalización depende de lo favorable que sea la combinación de factores que la impulsan. Así, utilizando una superficie adecuada es posible calcular un tiempo para el que una orina con una composición normal no cristalice, mientras que una orina litógena dé lugar al crecimiento de sales cálcicas sobre la misma. La detección del calcio generado en estas condiciones se efectúa utilizando una reacción colorimétrica. En resumen, son dos las reacciones que participan en el procedimiento: una reacción de precipitación y una reacción de complejación.

R. de precipitación: Ca^{2+} Oxalato/Fosfato > Oxalato/Fosfato cálcico

R. de complejación: Ca(II) redisuelta + arsenazo III > Complejo azul
pH=4,3

Para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención se ha diseñado un kit que está representado en la Figura 1 y que consta esencialmente de un recipiente contenedor conteniendo timol como esterilizante (1), dentro del cual se dispone un pocillo de reacción (2) en el que se encuentra situado el sustrato de reacción (3).

Para la realización del test se precisan los siguientes reactivos (preparados en agua bidestilada con reactivos de máxima pureza):

- Unidades de reacción

- Solución acuosa de ácido clorhídrico 2,3 N.
- Solución acuosa de acetato sódico anhidro 5% (p/v).
- Solución acuosa de arsenazo III 0,1% (p/v).

Todas las soluciones deben conservarse entre 2 y 8°C. Deben llevarse a temperatura ambiente (20 a 30°C) 30 minutos antes de su uso. Las soluciones de ácido clorhídrico y arsenazo III son estables durante los 90 días siguientes a su preparación cuando se conservan entre 2 y 8°C. La solución de acetato sódico es estable durante 30 días cuando se conserva entre 2 y 8°C.

Las unidades de reacción deben mantenerse cerradas y a temperatura ambiente (de 20 a 30°C).

La recogida de la muestra se realizará en un frasco estéril de 100 mL. La orina debe emitirse en ayunas, a ser posible se utilizará la primera micción matutina y en su defecto la siguiente, recogida siempre en ayunas.

No se deben añadir aditivos o preservativos a la muestra recogida.

Es fundamental que el ensayo se inicie con la orina recién emitida y aún caliente para evitar que se produzcan reacciones de precipitación debidas al enfriamiento de la orina. No deben utilizarse nunca muestras refrigeradas o congeladas.

El procedimiento de análisis de la invención conlleva una serie de etapas que se esquematizan en la Figura 2 y se detallan a continuación.

- 1.- Rotular la unidad de reacción con la identificación del paciente.
- 2.- Verter 40 mL de orina recién emitida en la placa. Comprobar que el pocillo de reacción se llena de orina. Tapar.
- 3.- Dejar reposar durante:
 - a) 12 h a temperatura ambiente (20 a 30°C)
 - b) 24 h a temperatura ambiente (20 a 30°C)
- 4.- Desechar el contenido de la placa contenedora.
- 5.- Lavar cuidadosamente la placa con 50 mL de agua bidestilada. No verter el agua directamente sobre el pocillo de reacción. Agitar 5 segundos con un movimiento rotacional suave. Desechar el agua.
- 6.- Dispensar 400 μ L de la disolución de ácido en el pocillo de reacción.
- 7.- Extender la solución por toda la superficie mediante un movimiento suave pero continuo con una espátula de plástico. Prolongar esta operación durante unos 2 minutos.
- 8.- Dispensar 2,8 mL de la disolución de acetato en el pocillo de reacción.
- 9.- Dispensar 150 μ L de la disolución del indicador en el pocillo de reacción.
- 10.- Mezclar con la espátula mientras se completa la reacción (aproximadamente 15 s).

- 11.- Interpretar el resultado cualitativa y/o cuantitativamente.

Se recomienda montar un control negativo diariamente como contraste para validar el resultado del test. El control negativo se prepara sobre el pocillo de una unidad de reacción nueva a la que se aplicará el protocolo anterior a partir del paso 6.

Una vez finalizado el ensayo se obtiene una solución coloreada. En función del color se evalúa el resultado cualitativamente como positivo o negativo.

- * Una orina no litógena, negativa, mostrará un color rosa similar al del control negativo.
- * Una orina litógena, positiva, mostrará un color azulado cuya tonalidad puede variar del violeta al azul.
- * Una orina con un riesgo litógeno cercano al cut-off, es decir, al límite de sensibilidad del ensayo, mostrará un color rosa con un ligero tono azulado.

En aquellos casos que se crea conveniente, el laboratorio de análisis clínico puede proceder a una interpretación cuantitativa de los resultados obtenidos. Para ello basta determinar la absorbancia de la solución coloreada a 650 nm frente a un blanco de agua bidestilada utilizando cubetas de 1 cm de camino óptico. En este caso el resultado se expresará en concentración de calcio (ug/mL y se calculará de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{Calcio}]_m = A_m \times [\text{Calcio}]_{\text{std}} / A_{\text{std}}$$

donde:

$[\text{Calcio}]_m$ es la concentración de calcio de la muestra.

A_m es la absorbancia de la muestra.

$[\text{Calcio}]_{\text{std}}$ es la concentración de calcio de una solución estándar.

A_{std} es la absorbancia de una solución estándar.

También se puede determinar directamente la concentración de calcio en la disolución coloreada mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) o espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

- * Para una orina no litógena la concentración de calcio en la solución coloreada estará comprendida entre 0 y 2 μ g/mL.
- * Para una orina litógena la concentración de calcio en la solución coloreada estará comprendida entre 3 y 30 μ g/mL. Raramente se han obtenido cristalizaciones por encima de 30 μ g/mL.
- * Para una orina con un riesgo litógeno cercano al cut-off, es decir, al límite de sensibilidad del ensayo, la concentración de calcio en la solución coloreada estará comprendida entre 2 y 3 μ g/mL.

Los resultados obtenidos con la aplicación del ensayo muestran una excelente discriminación entre el grupo de individuos sanos y el grupo de pacientes con importante actividad litiásica y orinas alteradas, lo que demuestra la utilidad del ensayo para evidenciar la existencia de alteraciones urinarias que pueden conducir a la formación de cálculos renales. Es evidente que si se desea detectar de forma específica alguna alteración concreta, será preciso efectuar un estudio analítico más detallado de la orina.

Es importante resaltar que puede darse el caso de que una orina claramente litógena pertenezca a un individuo que nunca ha formado cálculos renales, debido a que los factores morfoanatómicos del riñón están especialmente orientados a evitar el desarrollo de concreciones sólidas, por ejemplo, como consecuencia de la existencia de una capa de glicosaminoglicanos (capa antiadherente) particularmente bien desarrollada. Puede darse también el caso contrario, en el que, una orina totalmente normal desde un punto de vista litógeno, pertenezca a un individuo claramente litiásico, lo que debe atribuirse a una situación en la que los factores morfoanatómicos renales están claramente alterados, por ejemplo, por la presencia de una importante necrosis papilar, que favorecería la formación de cálculos renales. Debe considerarse también que la actividad litógena de un individuo no es la misma durante todos los días del año. Existen épocas, como por ejemplo durante el verano, especialmente adecuadas para el desarrollo de cálculos renales, y también debe considerarse la influencia de ciclos, como el ciclo menstrual que afecta a la eliminación de citrato. Es por tanto evidente que para un individuo litiásico pueden existir temporadas cuya orina no presenta actividad litiásica y otras con actividad. La aplicación del ensayo permitirá detectar indudablemente dichos períodos.

En conclusión el ensayo propuesto permite efectuar una evaluación global del riesgo urinario para formar cálculos cálcicos. Si el resultado es positivo, indicará una clara predisposición de la orina a la formación de cálculos cálcicos, de tal manera que si se desea conocer con más exactitud el factor o factores urinarios alterados (hipercalcemia, hipocitraturia...) será necesario un estudio analítico de la orina más completo. Si el resultado del test es negativo y se generan cálculos cálcicos en ausencia de infección urinaria, es un claro indicio de que la alteración que los produce radica básicamente en los factores morfoanatómicos renales.

Por tanto la aplicación del ensayo presentará un especial interés para:

- 1) Muestreo rápido de pacientes con litiasis cálcica con el fin de detectar aquellos individuos que presentan una orina alterada y que deben ser sometidos a un estudio urinario más completo.
- 2) Identificación de predisposición a la formación de cálculos renales cálcicos en individuos con un importante factor de riesgo litógeno (por ejemplo, en casos de existencia de antecedentes familiares directos).
- 3) Evaluación de la eficacia de una determinada terapia correctora del riesgo litógeno urinario.
- 4) Detección de períodos con actividad litógena acentuada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representa el kit de la presente invención, en la que (1) corresponde al contenedor conteniendo timol, (2) corresponde al pocillo y (3) corresponde al sustrato de reacción.

Figura 2: Representa un esquema ilustrativo del método de ensayo de la presente invención.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente, mediante los siguientes Ejemplos los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Se tomaron 40 mL de orina recién emitida y se depositaron a la placa contenedora comprobando que se llenaba el pocillo, se tapó y se dejó reposar durante 12 h a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se lavó cuidadosamente la placa con 50 mL de agua bidestilada con precaución de no verterla directamente sobre el pocillo de reacción, se agitó suavemente durante 5 segundos y se desechó el agua.

Seguidamente se dispensaron 400 μ L de una solución acuosa de ácido clorhídrico 2,3 N que se extendió cuidadosamente con espátula de plástico durante 2 minutos. Después de ello se dispensaron 2,8 mL de una disolución acuosa de acetato sódico anhidro al 5% (p/v) y 150 μ L del indicador. Se mezcló con la espátula durante 15 segundos y se observó formación de color rosa, indicativo de orina no litógena.

Ejemplo 2

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, empleando orina recién emitida de otro sujeto, la cual se mantuvo en contacto con el sustrato durante 24 h a temperatura ambiente.

La coloración al final de todas las fases del proceso fue azul, indicativa de una orina litógena.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos, **caracterizado** porque comprende las siguientes operaciones:

- a) verter 40 mL de orina recién emitida en una placa contenedora, asegurando que se llene un pocillo en su interior y que contiene el sustrato de reacción, tapar y dejar reposar durante: (i) 12 h a temperatura ambiente; o (ii) 24 h a temperatura ambiente;
- b) desechar el contenido de la placa, lavar con 50 mL de agua bidestilada y desechar el agua;
- c) dispensar 400 μL de una solución acuosa de

HCl diluida (2,3 N) y extenderla por toda la superficie del sustrato, seguidamente dispensar 150 μL de una solución acuosa de acetato sódico (5%, p/v) y 150 μL de una solución indicadora de arsenazo III (0,1%, p/v) y mezclar durante 15 segundos, tras lo cual se producirá una reacción coloreada que puede evaluarse cualitativa y/o cuantitativamente.

2. Kit para llevar a cabo el procedimiento de evaluación de la capacidad global de una orina para formar cálculos renales cálcicos, descrito en la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una placa contenedora conteniendo timol como esterilizante (1) provista de tapadera, en cuyo interior se encuentra un pocillo (2) conteniendo el sustrato de reacción (3).

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

FIGURA 1

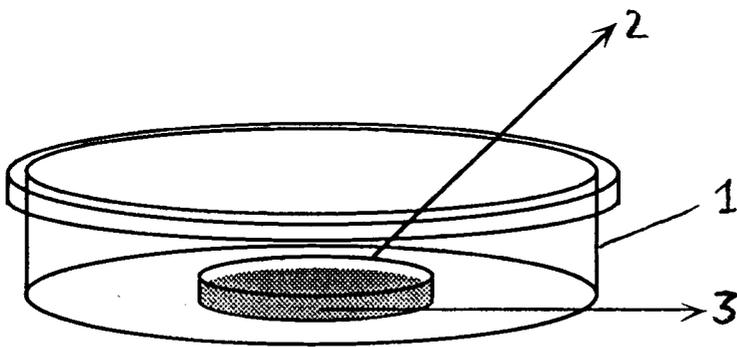
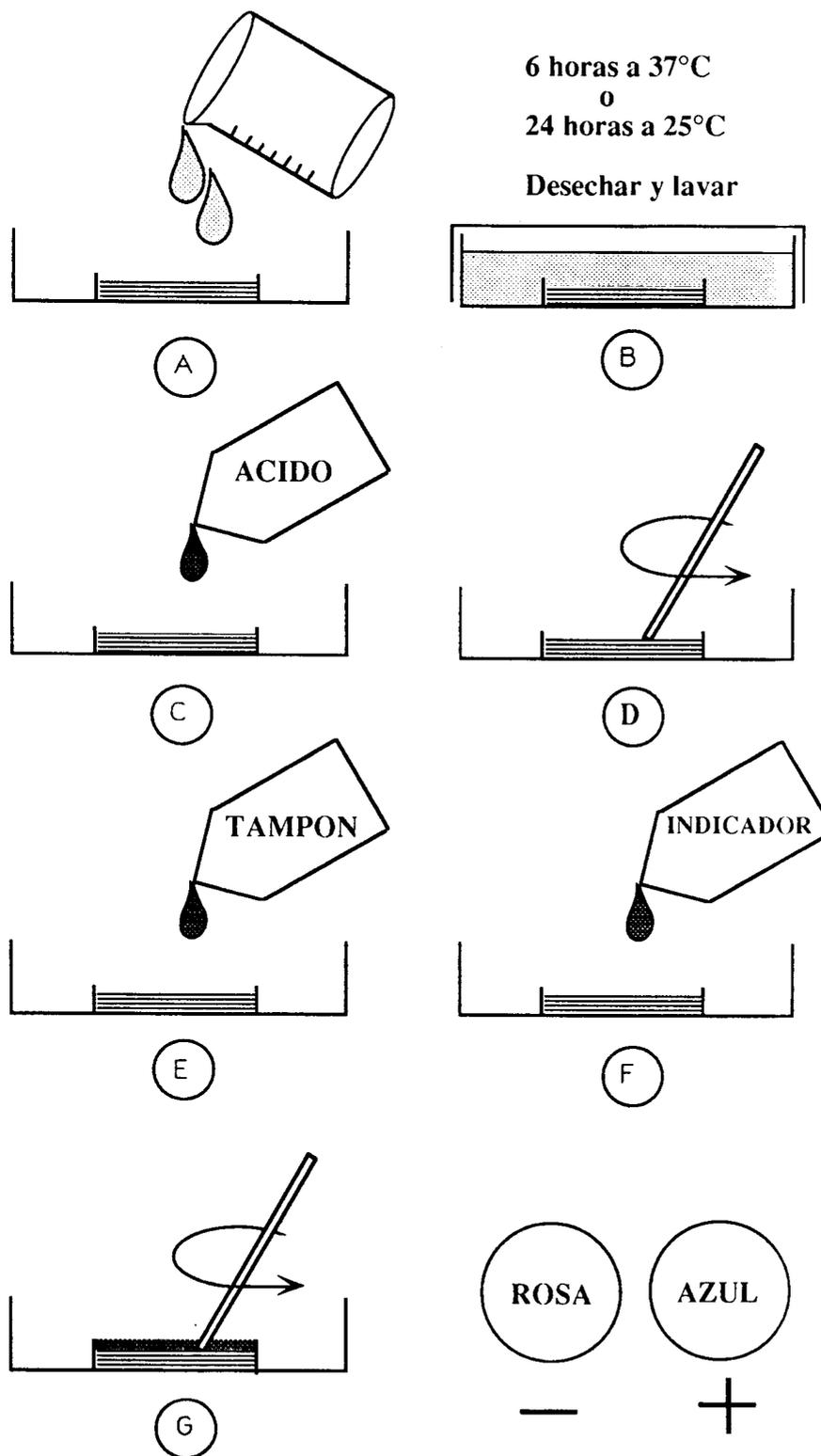


FIGURA 2





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/52, 33/84

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4399-A (S. SARIG et al.) 16.08.83	
A	BASE DE DATOS WPI Sección Ch, semana 9304, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D03, AN 93-034028 XP002024673 & SU-1715285-A (KONBIKORM SCI PRODN ASSOC.) 29.03.92 * Resumen *	
A	INTERNATIONAL UROLOGY AND NEPHROLOGY, Vol. 27, num. 6, 1993, páginas 653-661, XP000617397, F. GRASES et al. "A new procedure to evaluate the inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization in whole urine"	
A	US-4921807-A (CHARLES Y.C. PAK) 01.05.90	
A	ARTHRITIS & RHEUMATISM, Vol. 37, num. 9, 1994, página 5414 XP002024672, M.P. FERNANDEZ-DAPICA et al. "Quantitative analysis of basic calcium phosphate crystals in synovial fluid using Arsenazo III"	
P,X	ES-2088743-A (UNIVERSIDAD DE LAS ISLAS BALEARES) 16.08.96 * Columnas 3,4,6 *	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
09.03.98

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1



CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE (IET)

- ① N.º de publicación : ES 2 113 310 A1
- ② Número de solicitud: 9600572
- ④ Fecha publicación de la solicitud: 16.04.98
- ⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/52, 33/84

Pág./Línea	Errata/Omisión	Corrección
1/1	US-4399-A	US-4399003-A