

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 980**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2011 E 11738632 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2606147**

64 Título: **Procedimiento para el aislamiento de urea mientras se elimina el CO₂ nocivo**

30 Prioridad:

07.12.2010 EP 10193920

20.08.2010 EP 10173593

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.01.2015

73 Titular/es:

CYTONET GMBH & CO. KG (100.0%)

Albert-Ludwig-Grimm-Strasse 20

69469 Weinheim, DE

72 Inventor/es:

AYGEN, SITKE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 526 980 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento de urea mientras se elimina el CO₂ nocivo

La presente invención hace referencia a un método para el aislamiento de urea en muestras de sangre.

La urea es un compuesto orgánico que en el organismo humano equivale a un producto final del metabolismo de los compuestos de nitrógeno. En el hombre la urea es eliminada con la orina.

La formación de urea se lleva a cabo preferentemente en las células del hígado y parcialmente en los riñones. En la formación de urea en el cuerpo aparecen distintas enfermedades que pueden producir daños considerables. La determinación de la formación de urea es un indicador de la función del hígado, por ejemplo, en los trasplantes de hígado o trasplantes de células del hígado.

Tuchman y cols., Pediatric Research 2008(64), página 213 describen, por ejemplo, un defecto de la N-acetil glutamato-sintasa y el análisis de la formación de urea.

Para medir la formación de urea los pacientes recibían por vía oral acetato sódico marcado con ¹³C, que conducía a la formación de urea marcada con ¹³C; del acetato marcado con ¹³C se forma ¹³CO₂, que se transforma en ¹³C-fosfato de carbamilo y a continuación en ¹³C-urea.

La mayoría de elementos químicos existen en la naturaleza como mezclas de varios isótopos estables o radioactivos. Las frecuencias de los isótopos se indican normalmente incluso en los estudios de trazas con compuestos enriquecidos en la unidad del porcentaje de átomos (% átomos) o bien en ppm. Para describir las variaciones de las frecuencias naturales existe la escala relativa Delta en tanto por mil (‰). Los valores δ (por ejemplo, δ¹³C, δ¹⁵N, δ¹⁸O) se definen como la diferencia del correspondiente cociente de isótopos R [(isótopo pesado)/(isótopo ligero)], por ejemplo, $R^{13}C = \frac{^{13}C}{^{12}C}$ de la muestra frente a un estándar, con respecto a este estándar.

El valor δ¹³C se calcula, por ejemplo, conforme a:

$$\delta^{13}C = \frac{R_{Probe} - R_{Standard}}{R_{Standard}} \cdot 1000 = \left(\frac{R_{Probe}}{R_{Standard}} - 1 \right) \cdot 1000$$

El estándar para el carbono es una cal, PDB (Pee Dee Belemnite). Al incorporar CO₂ a la fotosíntesis se empobrece el carbono en ¹³C. La mayoría de plantas reducen el CO₂ en hidratos de carbono por medio de la vía del C3 o de Calvin-Benson. Esto conduce a que la biomasa de C3-plantas- (a estas pertenecen las plantas útiles, arroz, patatas, soja, remolacha y cereales) presente unos valores δ¹³C del orden de -24 hasta -32‰. Otras plantas fijan el CO₂ según la vía del C4 o Hatch-Slack. Los valores δ¹³C de los productos de C4-plantas- (maíz, mijo, remolacha) tienen valores δ¹³C del orden de -10 hasta -16‰. Por esta razón los valores δ¹³C pueden ser utilizados para examinar el origen y la originalidad de las sustancias orgánicas.

La determinación del valor δ¹³C de plasma-urea se lleva a cabo habitualmente mediante una reacción de la urea en CO₂ con ayuda de un enzima. Por lo tanto es importante que la solución de urea aislada del plasma esté exenta de CO₂ extraño. En general el CO₂ se encuentra en el plasma como CO₂ libre disuelto o como CO₂ ligado en forma de bicarbonato. Una liberación completa del plasma de CO₂ no es fácil; además se debe evitar que en el aislamiento se introduzca CO₂ en la muestra.

Para el aislamiento de la urea del plasma sanguíneo Tuchman y cols. Tuchman y cols. emplearon un método con los pasos siguientes:

Una muestra de plasma de 0,5 ml se mezclaba con 0,5 ml de H₂O y 40 μl de ácido perclórico del 60% y se separaba la proteína precipitada. A continuación se agitaba el recipiente durante 30 minutos, para permitir la liberación del CO₂. Después de trasladar la mezcla a un nuevo recipiente se ajustaba el pH en el intervalo de 6 hasta 7 con 300 μl de KOH 1M y se separaba el perclorato potásico precipitado. Se eliminaba el resto del bicarbonato con ayuda de una columna de intercambio iónico.

La columna se lavaba con 1 ml de HCl 10mM y el eluido se secaba en un recipiente de vidrio a 80°C. La muestra se agitaba durante la noche en un recipiente cerrado, en el cual se colocaba una pieza de gasa empapada con hidróxido sódico para recoger los residuos de CO₂.

A continuación se lavaba el recipiente con helio y se tapaba con un tapón de goma impermeable al aire. Se inyectaban 400 µl de tampón de fosfato potásico 0,5M pH 6,0 con 3 mg de ureasa-enzima/400 µl a través del tapón de goma. Al cabo de una hora se realizaba una adición de 100 µl de ácido fosfórico 20%, para liberar el CO₂ e interrumpir la reacción de la ureasa. El ¹³CO₂ liberado se medía con ayuda de un espectrómetro de masa (IRMS) de relaciones isotópicas.

Las investigaciones realizadas por la solicitante han demostrado que el método anteriormente descrito es muy sensible. Múltiples fuentes de CO₂ extraño pueden falsear los valores delta del CO₂ formado en la urea, medidos en este procedimiento. Es además muy costoso y lento. Debido a la escasa producción de urea se necesita un volumen mayor (0,5 ml) de plasma. Esto puede acarrear problemas en los niños. En una validación cruzada con Estados Unidos y Europa no se han observado diferencias comprensibles en los resultados.

Comparando los valores δ¹³C del CO₂ producido por la urea se puede constatar que en el método descrito por Tuchmann y cols. para el aislamiento de la urea del plasma, la eliminación del CO₂ nocivo no se consigue por completo. Los valores δ¹³C observados por Tuchmann y cols. son muy bajos -25 hasta -26‰.

La urea natural en plasma tiene un valor δ¹³C de -19 hasta -23‰, dependiendo de la nutrición.

El cometido de la invención consistía en preparar un método que superara algunos de los inconvenientes del método conocido.

El cometido se resuelve mediante un método para aislar urea y eliminar el CO₂ en las muestras de plasma, que comprenda las etapas siguientes:

- a) Preparar una muestra de plasma que contenga urea
- b) Añadir un ácido para eliminar parcialmente el CO₂
- c) Liofilizar la muestra para eliminar el CO₂ y obtener una muestra seca
- d) Redisolver la muestra seca y neutralizarla a un pH de 4 hasta 7, preferiblemente de 4 hasta 6,9, en particular de 4 hasta 6, con una solución tampón

El punto de partida para el aislamiento de la urea en una muestra de plasma es una muestra de plasma que contenga urea. Las muestras de plasma se pueden obtener de forma conocida a partir de muestras sanguíneas. Debido a la elevada reproducibilidad del método conforme a la invención son suficientes muestras de plasma con un volumen del orden de 0,2 hasta 0,3 ml, pero también se pueden emplear mayores cantidades.

La muestra de plasma contiene al menos urea con una relación natural de isótopos. Además se puede mezclar con urea enriquecida en ¹³C. Pero también se puede enriquecer si se le añade acetato o bicarbonato marcados con ¹³C. Se pueden administrar asimismo sales tolerables, por ejemplo, sales de sodio o potasio.

De acuerdo con la invención se mide la urea haciendo reaccionar la urea con ureasa para la liberación de CO₂, habiendo eliminado previamente el CO₂ existente.

En una configuración de la invención se realiza inicialmente una filtración. Para ello se añade disolvente para la precipitación, por ejemplo, acetonitrilo y/o ácido fórmico. Mediante esta filtración se pueden separar proteínas y lípidos del plasma. Para ello son especialmente adecuadas las conocidas columnas hybridSPETM, que son comercializadas por la empresa SUPELCO. Estas son también especialmente adecuadas para la eliminación de fosfolípidos.

Sin embargo, también se ha demostrado que se puede prescindir de la etapa de separación de proteínas y lípidos del plasma y se pueden obtener valores reproducibles igualmente buenos. La renuncia a la etapa de filtración ahorra tiempo por un lado y también gastos por otro lado.

De acuerdo con la invención se añade un ácido. Mediante la adición de ácidos se separa una parte del CO₂ de la muestra de plasma. Por ejemplo es apropiada la adición de ácido fosfórico en una concentración de aproximadamente un 20%. Respecto a una muestra de plasma de 0,3 ml es suficiente con una cantidad de 50 µl de ácido (por ejemplo, ácido fosfórico). Naturalmente también se pueden emplear otros ácidos.

Una etapa esencial del método conforme a la invención es la correspondiente liofilización de la muestra. La liofilización es un procedimiento en el cual se congela una muestra y se sublima en el vacío el agua contenida en ella. Este método es especialmente adecuado para la eliminación de las cantidades residuales de CO₂ en la muestra.

A continuación la muestra obtenida se disuelve y se lleva a un pH entre 4 y 7, preferiblemente entre 4 y 6,9, en particular entre 4 y 6, y especialmente entre 5 y 6. Para el ajuste del pH son adecuadas las soluciones tampón, por ejemplo, las soluciones tampón de fosfato con un pH de 9,0. También se pueden emplear otras soluciones tampón.

La sosa potásica empleada en Tuchman y cols es poco favorable puesto que contiene cantidades parcialmente elevadas de CO₂.

5 En una configuración de la invención y después de disolver las muestras secadas, se desgasifican para eliminar los residuos de CO₂ de la adición del tampón. Es especialmente adecuado utilizar un vacío entre 1 y 10 mbar durante 2 hasta 3 horas.

10 El resultado del procedimiento es una muestra que todavía contiene la urea del plasma, pero que básicamente está libre del CO₂ del plasma.

Para determinar el porcentaje de isótopos de la urea se recurre ahora a un método conocido que es la reacción con ureasa:

15 La muestra de nuevo disuelta se lava con un gas protector, por ejemplo, helio, nitrógeno o argón y se cierra herméticamente. A continuación se efectúa una adición de ureasa para que se forme el CO₂ de la urea existente. Por ejemplo, es apropiada una ureasa como la comercializada por la empresa Sigma. Se ha demostrado que es especialmente adecuada una cantidad de 20 hasta 100 unidades de ureasa para una muestra de plasma de 0,3 ml.

20 Seguidamente se realiza una incubación de la solución. Se ha demostrado que una temperatura de 36°C durante unos 60 minutos son los valores más apropiados para la incubación.

25 Luego se añade un ácido para interrumpir la posible reacción de la ureasa. Adicionalmente se liberará el CO₂ formado mediante la adición del ácido. Para una muestra de plasma de unos 0,3 ml de volumen se requiere el empleo de 100 µl de ácido fosfórico del 20%. En el recipiente hermético al gas se libera ahora el CO₂ procedente de la reacción de la urea en el plasma. Ahora se puede determinar el cociente de isótopos del CO₂. Para este cálculo es especialmente adecuado el IRMS. En el IRMS se mide la relación entre ¹³C y ¹²C con respecto a un patrón, tal como se ha indicado antes.

30 Para efectuar correctamente la prueba es importante que antes de la adición de ureasa se compruebe si la solución está libre de CO₂. Por ejemplo esto se puede realizar por medio de una espectroscopia IR-MS.

35 En una aplicación de la invención se administrará al paciente sustancias marcadas con ¹³C para medir la cinética de la formación de urea, para determinar la formación de urea marcada con ¹³C. En una configuración preferida de la invención se determina una cinética tal, que inicialmente se extraiga una muestra de sangre, antes de que un paciente injiera un precursor de urea marcado con ¹³C (valor basal), a lo que seguirá una o varias extracciones de sangre después de que el paciente haya ingerido el precursor de urea marcado con ¹³C. Se puede verificar aquí la formación de urea marcada con ¹³C.

40 De acuerdo con la invención, se pueden emplear cantidades de plasma entre 100 y 200 o bien 200 y 300 ml, es decir, en comparación con el método de Tuchman, es suficiente una muestra de sangre con la mitad de volumen. En particular si se emplea una cinética y se emplea el procedimiento en niños, es preferible que las cantidades de sangre extraída sean lo más pequeñas posible. En comparación con el método de Tuchman y cols. el procedimiento conforme a la invención tiene una mayor reproducibilidad y es menos costoso.

45 La presente invención hace referencia a los aspectos siguientes en una configuración especialmente preferida :

50 Aspecto 1: Procedimiento para el aislamiento de urea y eliminación de CO₂ de las muestras de plasma, que comprende los pasos siguientes a) Preparar una muestra de plasma, b) añadir un ácido para liberar parcialmente el CO₂, c) liofilizar la muestra para eliminar más CO₂ y obtener una muestra seca, y d) redisolver la muestra seca y neutralizarla a un pH de 4 hasta 7, preferiblemente de 4 hasta 6,9, en particular de 4 hasta 6, con una solución tampón.

55 Aspecto 2: Procedimiento conforme al aspecto 1, que se caracteriza por que antes de la adición de un ácido en el paso b) se realiza un filtración.

Aspecto 3: Procedimiento conforme al aspecto 1 ó 2, que se caracteriza por que después del paso d) la muestra se desgasifica a una presión reducida.

60 Aspecto 4: Procedimiento conforme al menos a uno de los aspectos 1 hasta 3, que se caracteriza por que la muestra en el paso d) se ajusta a un valor de pH de 5 hasta 6.

65 Aspecto 5: Procedimiento conforme al menos a uno de los aspectos 1 hasta 4, que se caracteriza por que la muestra de plasma procede de un probando o paciente, que ha ingerido un precursor de urea marcado con ¹³C antes de la extracción.

Aspecto 6: Procedimiento para determinar la relación de isótopos-¹³C de la urea en una muestra de plasma que comprende los pasos de aislamiento de la urea mediante un método conforme a uno de los aspectos 1 hasta 5, el lavado con gas protector, la adición de ureasa para formar el CO₂, la incubación, la adición de un ácido para liberar el CO₂ formado y la medición del cociente de isótopos-¹³C del CO₂ liberado.

Aspecto 7: Procedimiento para el diagnóstico del metabolismo de la urea que comprende los pasos de preparación de una primera muestra de plasma de un paciente, la determinación del cociente de isótopos-¹³C de urea en la primera muestra de plasma según el aspecto 6, la preparación de al menos otra muestra de plasma, procedente del paciente, en la que el paciente ha ingerido un precursor de urea marcado con ¹³C antes de la extracción, la determinación del cociente de isótopos-¹³C de la urea en al menos otra muestra de plasma conforme al aspecto 6 y la cuantificación de la cantidad de urea formada mediante el cociente de isótopos-¹³C en la primera muestra de plasma y en al menos otra muestra de plasma.

Aspecto 8: Procedimiento conforme al aspecto 7, que se caracteriza por que al menos se emplean otras dos muestras de plasma más.

Aspecto 9: Procedimiento conforme al aspecto 8 ó 9, que se caracteriza por que las otras muestras de plasma se han extraído en el intervalo de 15 a 240 minutos, después de que el paciente hubiera ingerido el precursor de urea marcado con ¹³C.

Aspecto 10: Procedimiento conforme a uno de los aspectos 8 ó 9, que se caracteriza por que las otras muestras de plasma son extraídas en un intervalo de 15 minutos, después de que el paciente hubiera ingerido el precursor de urea marcado con ¹³C.

La presente invención se refiere en particular a los aspectos siguientes A), B), C), D), E), F), G), H), I):

Aspecto A): Procedimiento para la determinación de urea en muestras de plasma que comprende los pasos siguientes a) Preparar una muestra de plasma que contiene urea, b) añadir un ácido, c) liofilizar la muestra para eliminar el CO₂ y obtener una muestra seca, d) redissolver la muestra seca y neutralizarla a un pH de 5 hasta 7 con una solución tampón, e) lavar o enjuagar con gas protector, f) añadir ureasa para crear CO₂, g) incubar, h) añadir un ácido para liberar el CO₂ formado y i) determinar el cociente de isótopos del CO₂ liberado.

Aspecto B): Procedimiento conforme al aspecto A), que se caracteriza por que antes del liofilizado se realiza una filtración.

Aspecto C): Procedimiento conforme al aspecto A) ó B), que se caracteriza por que después del paso d) la muestra se calienta a una temperatura entre 40 y 70°C.

Aspecto D): Procedimiento conforme a al menos uno de los aspectos A) hasta C), que se caracteriza por que se emplea el método IRMS para la determinación del cociente de isótopos de CO₂.

Aspecto E): Procedimiento conforme al menos uno de los aspectos A) hasta D), que se caracteriza por que antes de extraer una muestra de plasma se ha administrado acetato marcado con ¹³C.

Aspecto F): Procedimiento conforme al menos uno de los aspectos A) hasta E), que se caracteriza por que la muestra se ajusta a un pH de 5 hasta 6 en el paso d).

Aspecto G): Procedimiento para el diagnóstico del metabolismo de la urea que comprende los pasos de extraer una muestra de sangre de un paciente, obtener una muestra de plasma de la muestra sanguínea, determinar la urea en la muestra de plasma según el procedimiento conforme a uno de los aspectos A) hasta F), administrar un precursor de urea marcado con ¹³C, extraer al menos dos muestras de sangre en un intervalo de tiempo y determinar la urea para la obtención de las muestras de plasma de las muestras de sangre mediante un procedimiento conforme a uno de los aspectos A) hasta F).

Aspecto H): Procedimiento conforme al aspecto G), que se caracteriza por que tras administrar el precursor de urea, se extraen al menos dos muestras de sangre durante un periodo de tiempo de al menos 120 minutos, preferiblemente al menos 240 minutos.

Aspecto I): Procedimiento conforme al aspecto G o H), que se caracteriza por que entre las dos extracciones de muestras de sangre transcurre un intervalo de 10 hasta 20 minutos.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la reproducibilidad del procedimiento conforme al ejemplo 3.

La figura 2 muestra la curva de calibración del experimento Spiking conforme al ejemplo 4

La figura 3 muestra la reproducibilidad del procedimiento conforme al ejemplo 5.

La figura 4 muestra la curva de calibración del experimento Spiking conforme al ejemplo 6

Las figuras 5 y 6 muestran los resultados de la medición de la formación de urea conforme al ejemplo 7.

El procedimiento se aclara mediante los siguientes ejemplos.

5 **Ejemplo 1: Aislamiento de urea con filtración**

De una muestra de sangre se ha extraído plasma. 300 µl de plasma se han diluido con 200 µl de agua desionizada. A la muestra se han añadido 100 µl de acetonitrilo con ácido fórmico del 1%. En el recipiente se ha formado un precipitado. Las muestras se han filtrado a través de una columna HybridSPE.

10 El filtrado se mezclaba con 50 µl de ácido fosfórico 1M, se congelaba y liofilizaba. La muestra se ajustaba a un pH de 5,5 con una solución de tampón fosfato desgasificada 0,5M de pH 9. El recipiente para las muestras (Vacutainer) se lavaba con gas helio. A continuación se efectuaba la adición de 70 µl de una solución que contiene 15 mg/ml de Jack Bean Ureasa tipo III de la empresa Sigma en tampón fosfato. La muestra se incubaba durante una hora a 36°C.

15 Seguidamente se inyectaban 60 µl de ácido fosfórico del 20% a través del tapón, para parar la reacción de ureasa y liberar CO₂. A partir del CO₂ liberado se efectuaba la determinación del cociente de isótopos por medio de IRMS.

Ejemplo 2: Aislamiento de urea sin filtración

20 El procedimiento se llevaba a cabo como en el ejemplo 1, y generalmente no se realizaba la adición de acetonitrilo y de ácido fórmico ni tampoco la filtración, es decir, se liofilizaba directamente la muestra de plasma tras la adición del ácido. El otro método se realizaba de forma idéntica.

Ejemplo 3: Reproducibilidad del procedimiento

25 Una muestra de plasma se subdividía en cinco muestras que se sometían al procedimiento por separado según el ejemplo 1. Cada muestra de CO₂ obtenida se medía cinco veces. Las diferencias son mínimas, comparad con la figura 1.

Ejemplo 4: Experimento Spiking

30 A las muestras de plasma del ejemplo 1 se añadía urea marcada con ¹³C del 99% en una cantidad de 0,01 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg y las muestras se trataban conforme al procedimiento 1. La figura 2 muestra los correspondientes valores de medición. La curva de calibración se basa en una recta con un coeficiente de correlación de 0,99923.

Ejemplo 5: Reproducibilidad

35 La medición de la reproducibilidad conforme al ejemplo 3 se repetía para el procedimiento sin filtro conforme al ejemplo 2. La figura 3 muestra los resultados. Existe también aquí una reproducibilidad sorprendente.

Ejemplo 6: Experimento Spiking

40 Se repetía el experimento Spiking conforme al ejemplo 4, de manera que se empleaba el procedimiento conforme al ejemplo 2. La recta de calibración correspondiente se puede ver en la figura 4. Su coeficiente de correlación equivalía a R=0,99959

Ejemplo 7: Medición de la formación de urea

45 Se extraía sangre de dos probandos y se fabricaba plasma a partir de 300 µl de plasma. Se aislaba la urea siguiendo el procedimiento conforme a la invención y se determinaba la relación de isótopos ¹³C/¹²C de la urea.

Para ello se medía cada muestra cinco veces y se averiguaba el valor basal por medio del valor promedio. Luego se administraban 27 mg/kg de acetato sódico marcado con ¹³C del 99%.

55 El procedimiento de la extracción de sangre y la determinación de la relación de isótopos ¹³C/¹²C de la urea aislada se repetía a intervalos de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 y 240 minutos. Una parte pequeña del acetato marcado con isótopos ¹³C era transferida al cuerpo en la urea y se detectaba gracias a la sensibilidad de la medición. La cinética de la nueva urea formada se averiguaba midiendo los valores delta (incremento de la relación de isótopos ¹³C/¹²C) La cinética de la formación de urea se ha representado en las figuras 5 y 6.

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para el aislamiento de urea y eliminación de CO₂ de las muestras de plasma que comprende los pasos siguientes
 - a) Preparar una muestra de plasma
 - b) Añadir un ácido para eliminar parcialmente el CO₂
 - c) Liofilizar la muestra para eliminar el CO₂ y obtener una muestra seca
 - d) Redisolver la muestra seca y neutralizarla a un pH de 4 hasta 7 con una solución tampón
- 10 2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, que se caracteriza por que antes de añadir un ácido al paso b) se realiza una filtración.
- 15 3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza por que después del paso d) la muestra es desgasificada a presión reducida.
- 20 4. Procedimiento conforme al menos una de las reivindicaciones 1 hasta 3, que se caracteriza por que la muestra en el paso d) se ajusta a un valor de pH de 4 hasta 6, preferiblemente de 5 hasta 6.
- 25 5. Procedimiento conforme al menos una de las reivindicaciones 1 hasta 3, que se caracteriza por que la muestra en el paso d) se ajusta a un valor de pH de 4 hasta 6, preferiblemente de 5 hasta 6
- 30 6. Procedimiento para la determinación de la relación de isótopos-¹³C de la urea en una muestra de plasma que comprende los pasos
 - Aislamiento de urea mediante un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 5
 - Lavado con gas protector
 - Adición de ureasa para formar el CO₂
 - Incubación
 - Adición de un ácido, para liberar el CO₂ formado
 - Medición de la relación de isótopos-¹³C del CO₂ liberado
- 35 7. Procedimiento para el diagnóstico del metabolismo de la urea que comprende los pasos de
 - Preparar una primera muestra de plasma de un paciente
 - Determinar la relación de isótopos-¹³C de la urea en la primera muestra de plasma conforme a la reivindicación 6,
 - Preparar al menos otra muestra de plasma que proceda del paciente de tal forma que haya sido extraída del paciente antes de la ingestión del precursor de urea marcado con ¹³C,
 - Determinar la relación de isótopos-¹³C de la urea en al menos otra muestra de plasma conforme a la reivindicación 6,
 - Cuantificar la cantidad de urea formada mediante la relación de isótopos-¹³C de la urea en la primera muestra de plasma y en al menos otra muestra de plasma.
- 40 8. Procedimiento conforme a la reivindicación 7, que se caracteriza por que al menos se utilizan otras dos muestras de plasma.
- 45 9. Procedimiento conforme a la reivindicación 8, que se caracteriza por que se obtienen otras muestras de plasma en el intervalo de 15 hasta 240 minutos, después de que el paciente haya ingerido el precursor de urea marcado con ¹³C.
- 50 10. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 8 ó 9, que se caracteriza por que se han obtenido otras muestras de plasma en el intervalo de 15 minutos después de que el paciente haya ingerido el precursor de urea marcado con ¹³C.

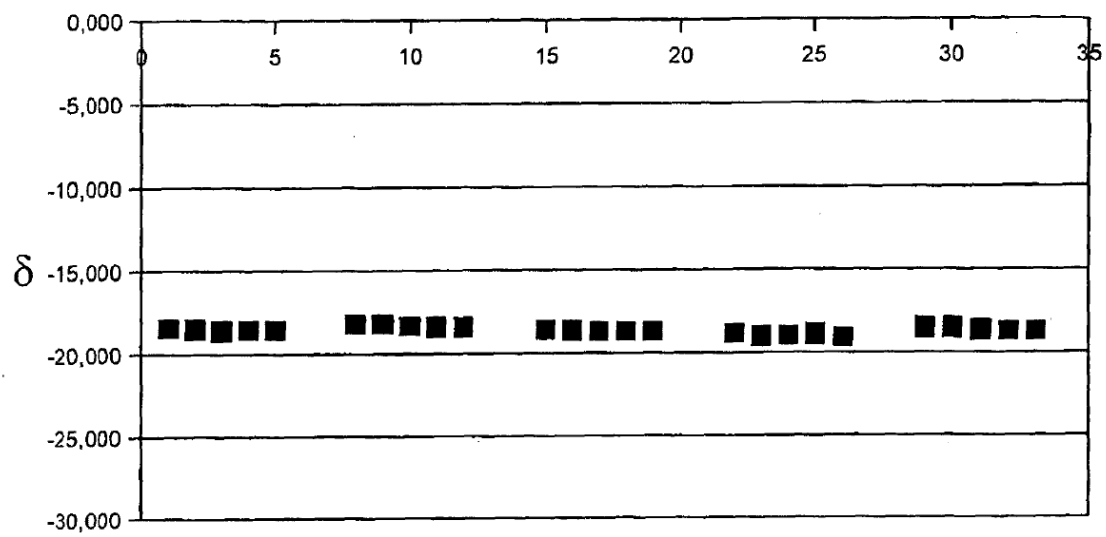


Fig.1

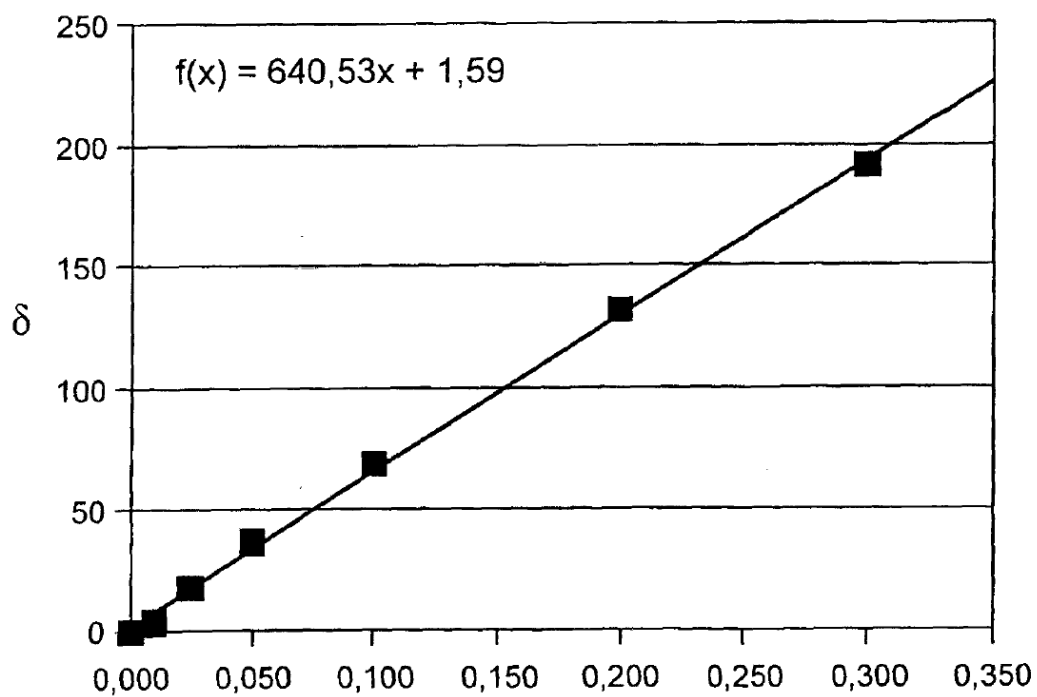


Fig.2

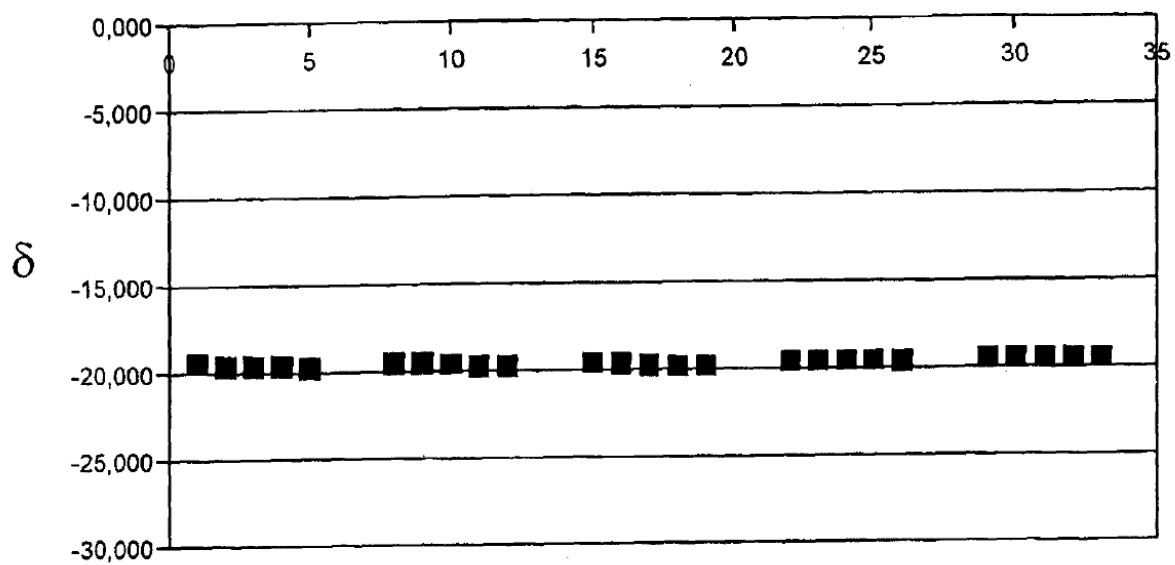


Fig.3

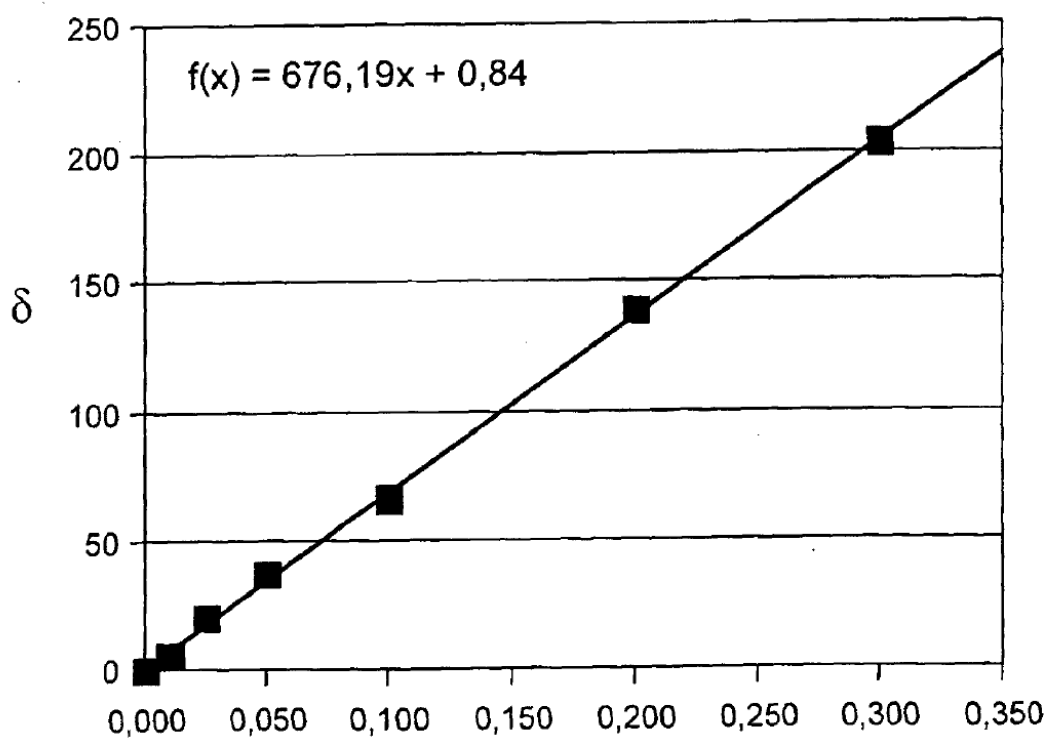


Fig.4

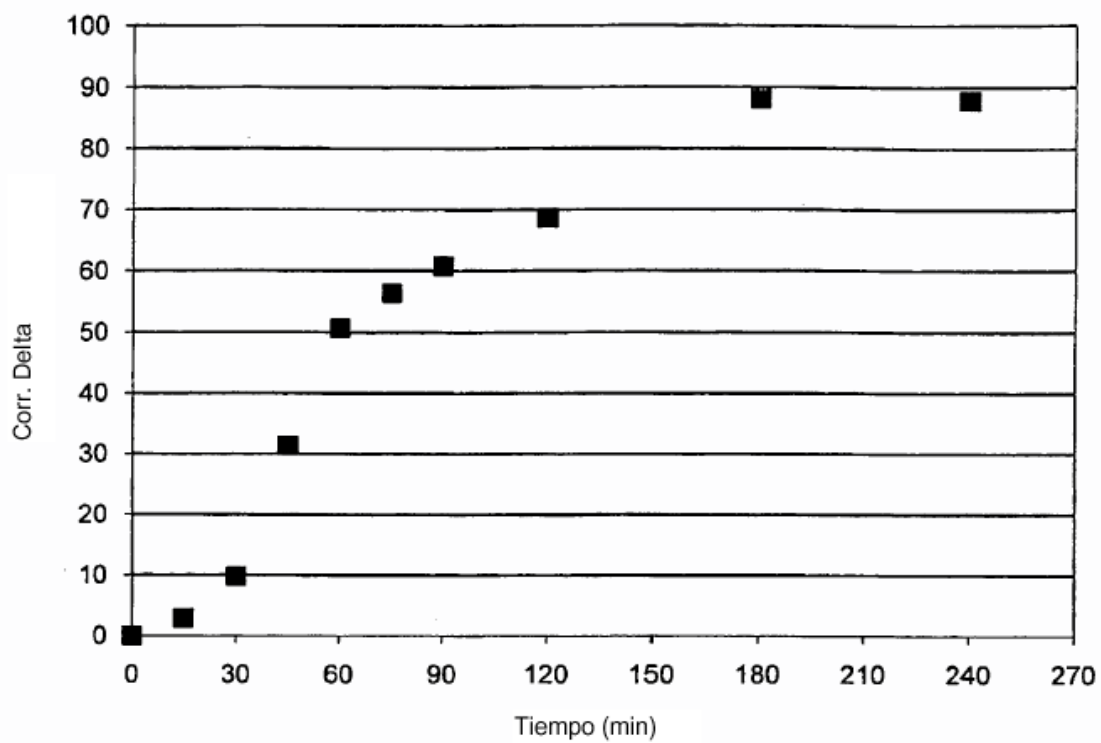


Fig.5

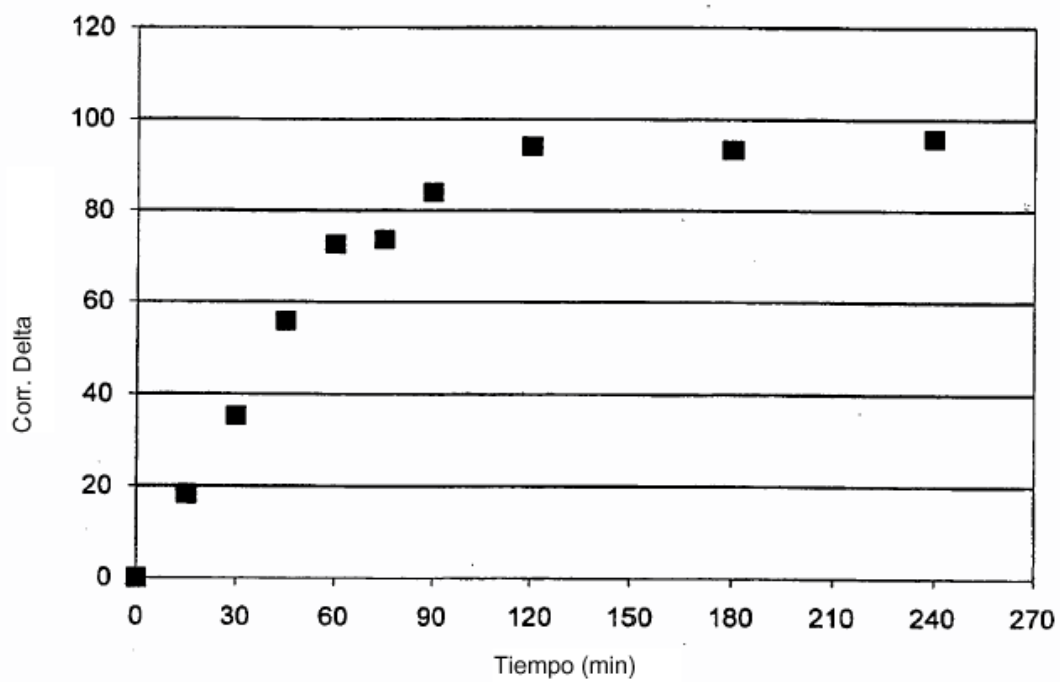


Fig.6