

26 SET. 1975

440.870

P.-61.249

S 97-1 E

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: G01N

para solicitar PATENTE DE INVENCION

A. nombre de KOMMANDITGESELLSCHAFT SCHWARZHAUPT

CONCEDIDA

14 FEB. 1977

entidad alemana

establecida en Sachsenring 37-47, 5 Köln 1, República
Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION EN COMUN DE
VARIAS O DE TODAS LAS ISOENZIMAS DE LA LACTATODES
HIDROGENASA"

10.9.75

- 1 -

**POOR
QUALITY**

El invento concierne a un procedimiento para la determinación en común de las isoenzimas de la lactatodeshidrogenasa (LDH) mediante reacción de lactato y nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD^+) para formar piruvato.

5 Es sabido que la lactatodeshidrogenasa, usualmente denominada LDH, aparece en forma de cinco isómeros. Para la determinación de la actividad de isoenzimas individuales constituyen características importantes diferentes óptimos del substrato y del pH que todavía no eran
10 conocidos completamente para las isoenzimas individuales.

Para la determinación de todas las isoenzimas, hasta ahora o bien se han separado por electroforésis las isoenzimas (véase, por ejemplo, "Die Isoenzyme der Lactatdehydrogenase", serie Biochemie und Klinik de S. L. Kowalewski, editado por la G. Thieme Verlag, Stuttgart 1972, página 29) o bien se mantiene en solución toda la LDH, se fijan las LDH 2 hasta 5 y se determina la LDH-1, que se presenta con la mayor frecuencia. Una panorámica acerca del método de trabajo normal actual se encuentra, por ejemplo, en el libro "Enzymatische Analyse", volumen I, Verlag Chemie, Weinheim 1970, página 557. Según ésta, se prescribe un óptimo de pH entre 8,3 y 8,9 para la reacción de lactato para formar piruvato. En realidad, en todos los métodos de determinación conocidos se utiliza un margen de pH
20 básico o como máximo casi neutro, con el fin de abarcar lo
25

más completamente que sea posible las isoenzimas.

Por parte de Lamprecht y otros (Cardiology 56:
371 - 375 (1971/72) y Fortschritte der Klinischen Chemie,
Enzyme und Hormone, Verlag der Wiener medizinischen Aka-
5 demie 1972, páginas 277 hasta 283 se comprobó que algu-
nas isoenzimas particulares pueden convertirse unas en
otras mediante variación del pH, es decir tiene lugar una
variación de configuración.

El invento se ha establecido la misión de eli-
10 minar las complicadas etapas de trabajo de la separación,
que tienen lugar en los procedimientos conocidos, y asimis-
mo suprimir las irregularidades e inexactitudes de la de-
terminación global que siguen pudiendo comprobarse, y ga-
rantizar una determinación óptima de la totalidad de las
15 isoenzimas de LDH, en particular de las isoenzimas 4 y/o
5, pero también de la isoenzima 3. Además, el invento
debe presentar una combinación de reactivos y posibilida-
des de utilización especiales del procedimiento.

Se ha comprobado que una disminución del valor
20 del pH por debajo del punto neutro en la reacción en sí
conocida, de lactato y NAD para formar piruvato, conduce
a una determinación óptima de la totalidad de las isoen-
zimas de LDH, pero especialmente de las isoenzimas 4 y 5.
En este caso es interesante sobre todo el hecho de que
25 sólo en el caso de medición en el pH ácido se determinan

completamente la LDH 4 y la LDH 5. De este modo se hace óptima la cantidad total de todas las enzimas de la LDH determinadas en el caso de efectuarse la medición en el margen ácido y es posible determinar la LDH 4 o la LDH 5 solas, o totalmente en mezcla entre sí, pero también con otras isoenzimas de LDH.

Por consiguiente, es objeto del invento un procedimiento para la determinación en común de varias o de todas las isoenzimas de la lactatodeshidrogenasa (LDH), especialmente de las isoenzimas 4 y 5 así como de la isoenzima 5 sola, mediante reacción de lactato y nicotin-amidoadenin-dinucleótido (NDA⁺) para formar piruvato, al cual procedimiento está caracterizado porque la reacción se lleva a cabo a un valor de pH específico para el sistema de tamponamiento utilizado, en el caso de un agente tamponador de trietanolamina-NaOH un pH de 6,3 hasta 6,4. Para la reacción es suficiente una pequeña cantidad de líquido, pero dicha reacción se lleva a cabo convenientemente en un medio líquido.

En efecto, se comprobó además que el óptimo de la determinación global de varias isoenzimas también depende del agente tamponador. Para la mayor parte de los agentes tamponadores este óptimo se encuentra en un valor de pH de aproximadamente 6 a 6,5. Si se quiere trabajar en agente tamponador de fosfato, se puede ciertamente medir todavía,

pero en este caso se determina sólo una cantidad parcial del mismo, por ejemplo, la isoenzima 5 a pH 7,9. No obstante, un valor de pH ácido es esencialmente más apropiado para la determinación en común de varias isoenzimas. Un pH de aproximadamente 6,3 a 6,4 es apropiado especialmente para la determinación en común de las LDH 4 y 5, que pueden aparecer por ejemplo en el líquido vaginal.

Preferiblemente en el medio de reacción se deja dispuesta una gran capacidad de agente tamponador. Esto tiene la ventaja de que ni siquiera en el caso de la investigación de líquidos corporales con un valor de pH que se diferencia grandemente del pH 6 se pasa por encima a por debajo del valor de pH óptimo durante la reacción.

La reacción se efectúa de manera en sí conocida a una temperatura de aproximadamente 37°C. En tal caso las cantidades de coenzima se ajustan de manera tal que sean suficientes de modo óptimo para todas las isoenzimas presentes, lo cual puede ser determinado, tomando en consideración los siguientes datos, con unos pocos ensayos rutinarios.

La determinación de LDH es de gran importancia especialmente en el caso de la investigación de líquidos corporales. Mientras que estas isoenzimas son retenidas predominantemente en los tejidos en el caso de seres humanos sanos, se las encuentra, en el caso de crecimiento

anormal de tejidos o en el caso de leucemia o de otras enfermedades, en una concentración apreciable en el suero o en otros líquidos corporales. Especialmente puede comprobarse que en el caso de variaciones patológicas en el tracto genital femenino inferior, dichas isoenzimas están contenidas en el líquido vaginal.

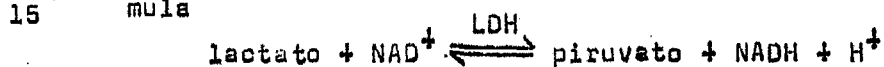
El método de determinación de acuerdo con el invento es utilizable para todos los líquidos corporales. El ajuste del valor del pH de la muestra a investigar depende del valor de pH propio de la muestra. En cualquier caso para la reacción propiamente dicha debe existir un pH de 6,3 a 6,4, en especial de aproximadamente 6,3. Por consiguiente, hay que ajustar la composición del reactivo para la realización de la determinación.

Mientras que en el método normal (véase Enzymatische Analyse, volumen I, entre otros) se prescribe un óptimo de pH entre 8,3 y 8,9, de acuerdo con el invento uno se aleja intencionadamente de este margen de pH. La razón para el establecimiento del margen de pH básico arriba mostrado hay que buscarla en el hecho de que durante la reacción

$$\text{lactato} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
se forma un protón en la proporción estequiométrica con respecto al grado de conversión del lactato. Con el fin de desplazar hacia la derecha este equilibrio del LDH, se trabaja en el margen alcalino.

Por el contrario, de acuerdo con el invento, por ejemplo en el caso de la determinación en el suero o en plasma, la muestra a investigar es tamponada a aproximadamente pH 6,3 a 6,4 con trietanolamina-NaOH y se ajusta a este valor también la combinación de ensayo (reactivo de ensayo) utilizada para la investigación. Dicho a grandes rasgos y para determinaciones de cálculo aproximado se ajusta un valor de pH de 6,0 hasta 6,5 y se tampona de modo tal que durante la determinación propiamente dicha se presente un valor de pH de 6,3 a 6,4. En el caso de albúmina de suero se añade, de manera en sí conocida, glutatión.

Las isoenzimas de la lactatodeshidrogenasa pueden ser determinadas de modo óptimo con un pH de 6,3 a 6,4, si se procura que el equilibrio de la reacción de la fórmula



sea desplazado hacia la derecha mediante reacciones posteriores. Para este fin se añade metosulfato de fenazina, mediante el cual se vuelve a oxidar de nuevo la coenzima NADH. La medición entre pH 6,0 y 6,5 ofrece por primera vez la posibilidad de determinar completamente la LDH 5. Esto es interesante sobre todo debido a que la presencia de LDH es un indicio de la existencia de carcinomas y por consiguiente la medición exacta y sensible es un medio para el reconocimiento y la detección precoz de carcinomas.

En el caso de ciertos líquidos corporales, no obstante, las condiciones arriba descritas son diferentes, ya que estos líquidos corporales tienen un valor de pH propio que se diferencia de modo pronunciado del pH de 6,3 a 6,4. Uno de tales líquidos corporales es especialmente el líquido vaginal, cuyo valor de pH se encuentra en aproximadamente 4. Aquí, por medio de la combinación de ensayo utilizada, se tiene que ajustar durante la reacción el valor del pH óptimo, lo cual significa que la combinación de ensayo tiene un valor de pH más elevado, que luego, por el valor del pH del líquido vaginal, es llevado a aproximadamente pH 6 a 6,5.

Por consiguiente el invento, de acuerdo con una forma de realización adicional, concierne a una combinación de ensayo que consta de lactato, nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD^+) y una sal de tetrazolio para hacer visible la reacción enzimática de NAD, que está tamponada a un valor de pH tal que durante la reacción propiamente dicha existe en el líquido corporal a investigar un valor de pH específico para el agente tamponador de 6,3 a 6,4, por ejemplo para tampón de trietanolamina-NaOH u otros agentes tamponadores ajustables en el margen ácido con excepción del agente tamponador de fosfato. En el caso de utilizarse un preparado seco, por consiguiente, este pH debe estar presente después de haber disuelto dicho

preparado. Es apropiado en cuanto al orden de magnitud un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5

5 Para el caso especial de la investigación de un líquido vaginal que por su parte no se ha modificado en su valor de pH original, es apropiada especialmente la utilización de la determinación con agente tamponador de trietanolamina-NaOH, siendo ajustada la combinación de ensayo a pH, 7,0 mientras que en el caso de muestras a investigar ajustadas a pH 6,3 a 6,4 también se ajusta la combinación de ensayo a este valor.

10 Por consiguiente, el invento concierne además a la utilización del procedimiento según el invento y de la combinación de ensayo según dicho invento al caso especial de la investigación de líquido vaginal en la vagina mediante un material de ensayo con el fin de comprobar una eventual variación patológica en el tracto genital femenino, siendo aplicada la combinación de ensayo sobre soportes apropiados, especialmente sobre un tampón, pero también, por ejemplo, sobre tiras de ensayo, y produciéndose, por inmersión en la vagina, la reacción con las isoenzimas de LDH presentes en dicha vagina a un pH de aproximadamente 6,0 a 6,5, especialmente de 6,3 a 6,4.

20 La combinación de ensayo consiste en una solución con la siguiente composición:

25

		<u>carga de</u> <u>ensayo</u> <u>preferente</u>	<u>Márgenes límites</u> <u>inferiores y su-</u> <u>periores</u>
5	Agente tamponador de trietanolamina-NaOH, pH 7,0	5,0 mM	1,0 - 150 mM
	Lactato de Na (sal sódica del ácido D,L- láctico)	67,5 mM	20 - 350 mM
10	Metosulfato de fenazi na (PMS)	0,1 mM	0,01 - 1,0 mM
	Nicotinamido-adenin- dinucleótico (NAD ⁺)	1,5 mM	0,1 - 10 mM
15	Nitro-azul-cloruro de tetrazolio (NAT)	0,3 mM	0,01 - 1,5 mM

20 Esta combinación de ensayo, en estado protegido con respecto a la luz, es aplicada sobre un soporte apropiado, especialmente un tampón y éste es conservado en estado protegido con respecto a la luz hasta que haya de ser utilizado.

25 La presencia de LDH en el líquido vaginal es indicada por el hecho de que después de aproximadamente 5 a 10 minutos el tampón adopta una coloración azul. Tiene lugar el siguiente transcurso de reacciones:

1. lactato + NAD^+ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ piruvato + $\text{NADH} + \text{H}^+$
2. $\text{NADH} + \text{metosulfato de fenazina} + \text{H}^+ \longrightarrow$
 $\text{NAD}^+ + \text{metosulfato de fenazina reducido.}$
3. metosulfato de fenazina reducido + nitro-azul-cloruro
 5 de tetrazolio \longrightarrow formazano + metosulfato de
 fenazina.

Dado que la segunda reacción y también la tercera reacción acopladas con la reacción de lactato retira también la coenzima reducida formada, la primera reacción, es decir el equilibrio de la reacción de lactato es desplazado hacia la derecha todavía más intensamente por esta razón, al efectuar el tamponamiento de la carga de ensayo a pH 7,0 después de insertar el tampón, la reacción propiamente dicha ocurrirá a un pH de alrededor de 6, especialmente de 6,3 a 6,4. En este caso se determinan de modo óptimo las isoenzimas, especialmente la LDH 4 y la LDH 5 que pueden presentarse en el caso de variaciones anormales del líquido vaginal.

En el caso de las combinaciones de ensayo que han de ser utilizadas en la vagina, ha de escogerse un agente tamponador que sea estable y compatible con los tejidos. Para ello es especialmente bien apropiado el agente tamponador de trietanolamina-NaOH.

La combinación de ensayo puede ser aplicada de un modo deseado cualquiera sobre los soportes a utilizar,

especialmente un tampón. Es sabido que la manipulación con tales combinaciones de ensayo debe efectuarse de modo protegido con respecto a la luz, y que el soporte provisto con la combinación de ensayo debe ser conservado ampliamente con exclusión de la luz hasta que pase a utilizarse. Dos métodos ventajosos para la incorporación de la combinación de ensayo en un tampón son respectivamente una inyección de aproximadamente 2 ml de la combinación de ensayo preferida o la impregnación de un extremo de tampón en una longitud de aproximadamente 3/4 cm también con aproximadamente 2 ml de combinación de ensayo y el subsiguiente secado, especialmente el secado por congelación del tampón. No obstante, la combinación de ensayo puede ser aplicada también por ejemplo solamente sobre un cordón de recuperación, que posteriormente, cuando sea necesario, puede ser retirado con facilidad del tampón. Es muy favorable también la aplicación de la combinación de ensayo sobre un artículo de algodón en forma de banda o de cordel, que está insertado en el tampón.

Dado que en el caso de la utilización para la determinación rápida de una variación patológica en el tracto genital femenino inferior mediante incorporación en la vagina no se conoce, naturalmente, qué cantidad de líquido vaginal está presente y la cantidad varía de un

caso a otro al igual que el valor del pH posible del líquido vaginal, hay que prever una gran capacidad de tamponamiento en la combinación de ensayo para que durante la determinación propiamente dicha se mantenga en el lugar de reacción un valor de pH de 6 a 6,5, especialmente de aproximadamente 6,3 a 6,4. Dado que la capacidad de tamponamiento de la combinación de ensayo presente en el cordón de recuperación no es suficiente algunas veces en la práctica, es conveniente en tal caso colocar en dicho caso una cantidad mayor de sustancia tamponadora en el tampón, de manera que se garantice en cualquier caso un suficiente tamponamiento junto a la parte del cordón de recuperación situada más próxima al tampón.

Tales soportes provistos con la combinación de ensayo no necesitan ser utilizados por un médico, sino que cada mujer puede efectuar por sí misma la utilización. Una coloración de azul después de una permanencia durante 15 a 30 minutos del tampón en la vagina indica el peligro de una variación patológica y es una señal de aviso para consultar al médico.

No obstante, si el tampón usado, el cordón de recuperación o el cordel de recuperación deben ser por ejemplo, archivados, lo cual puede ser oportuno en el caso de la utilización por el médico, o cuando la paciente quiera enviar el tampón al médico, debe efectuarse un tra

tamiento posterior del tampón usado, a saber, con el fin de eliminar la molestia del olor, desinfectar el tampón y garantizar la estabilización de la coloración con el fin de efectuar una conservación durante largos espacios de tiempo. Se encontró además que este tratamiento ulterior se puede efectuar por inmersión del tampón utilizado para la investigación en una solución al 20% de Paraloid (Paraloid de la firma Merck, disuelto al 20% en tolueno).

Mientras que los métodos hasta ahora conocidos para la determinación de LDH son manifiestos métodos de laboratorio, que además de ello tienen las desventajas que se han descrito al comienzo, también en el presente caso existe la posibilidad de una determinación suficientemente cuantitativa y rápida para ciertas finalidades de utilización, por ejemplo para líquido vaginal, por parte de un usuario no adiestrado. Esto es importante especialmente en el caso de pacientes con tumores o abscesos. En un gran número de pacientes con tumores se han investigado de acuerdo con la bibliografía hasta hoy día 26 enzimas. La LDH posee la máxima sensibilidad para diagnóstico; en el suero (no en excretas) se encuentra un aumento entre 40 y 90%. En el caso de haberse comprobado el tumor, la determinación en serie del LDH en el suero es apropiada para el control del transcurso y de la tera

5 pia del mismo. Ciertamente, un aumento del LDH no es de ningún modo específico para el tumor. No obstante, siempre constituye una indicación acerca de una grave enfermedad y en unión con otras características es apropiado para apoyar la diagnosis supuesta de un tumor.

La presente combinación de ensayo preferida, aplicada sobre tampones, se utilizó "in situ" en el caso de investigaciones en serie con aproximadamente 100 mujeres sanas y con mujeres pacientes con Carcinoma colli uteri, Carcinoma corporis y Carcinoma. Para obtener los mejores resultados el tampón es insertado durante 15 a 30 minutos. Después de la retirada del mismo se pueden comprobar inmediatamente las siguientes coloraciones:

ninguna coloración	negativa
15 coloración de rosa	todavía negativa
azul clara con matiz violeta	+
azul	++
azul oscura	+++

20 Cuando apareció una coloración azul (++) o una coloración azul oscura (+++), se presentaba en todos los casos un carcinoma, lo cual coincidía con los resultados de ensayos patológicos. En el caso de coloración azul clara se pudo confirmar casi sin excepción la diagnosis "zona de transformación". Una coloración rosa se encontró hasta ahora solamente en mujeres

25

sanas (también en embarazadas hasta el día 15º).

El procedimiento de determinación "in vitro", es decir por ejemplo la investigación de suero o plasma, se lleva a cabo de manera en sí conocida. La única modificación necesaria es el ajuste de un valor del pH específico para el agente tamponador, por ejemplo de alrededor de 6 a 6,5 a diferencia del valor de pH fuertemente básico hasta ahora utilizado, de manera que no es necesario aquí efectuar ninguna descripción detallada. Para de terminaciones absolutas se puede llevar a cabo un calibrado del cambio de color con ayuda de una muestra de LQH patrón. La muestra de calibrado, tal como se describe para la conservación del tampón, debe ser conservada en cuanto al color durante algún tiempo.

Los siguientes ejemplos muestran además dos posibilidades de aplicar la combinación de ensayo sobre un tampón.

a) Método de inmersión:

Tampones higiénicos usuales, por ejemplo "o.b" de la firma Doctor Carl Hahn, son enrollados aplicándose apretadamente de una a dos veces de modo similar a un cinturón en el centro con una cinta adhesiva Tesa de 1 cm de anchura. La envoltura del tampón es abierta junto al lado opuesto del tampón, junto al que se encuentra el hilo de recuperación. De este modo, la superficie cilíndrica

del tampón se encuentra libre. De tubos se ensayo usuales en el comercio con un contenido de 18 ml (formato DIN, firma Schott, Mainz) se suprime la caperuza o cúpula del fondo. En el tubo de vidrio así obtenido se introduce el tampón de manera tal que el tampón abierto junto a un lado cierra con su plano con superficie alineada con la del extremo del tubo. El hilo de recuperación es fijado al otro extremo del tubo con vendaje aglutinante, cinta adhesiva Tesa o materiales similares. El lado del tubo con la envolvente de tampón abierta es sumergido en la solución mencionada bajo 1). Por cada tampón se absorben o succionan 2,0 ml. La formulación de la solución y todas las manipulaciones aquí explicadas, que se efectúan en unión con la solución de combinación de ensayo, han de ser realizadas en una cámara oscura con luz monocromática (lámpara para fotografía en el margen rojo, "luz roja").

Los tampones preparados de este modo, junto con el tubito de vidrio, son secados por congelación (liofilizados) en la oscuridad. Los tampones secados son retirados del tubito, por ejemplo por el hilo de recuperación y, siempre en la oscuridad o en la cámara oscura con luz para fotografía, son envasados con papel o con láminas impermeables a la luz o con papel coloreado y son conservados de modo protegido con relación a la luz.

b) Método de inyección:

Los siguientes trabajos se llevan a cabo en la cámara oscura. Con ayuda de una jeringa de 2 ml se inyectan en el tampón 2,0 ml de la solución de combinación de ensayo indicada bajo 1). Por el lado opuesto del tampón, en el que se encuentra el hilo de recuperación, se clava la aguja de inyección a través de la envolvente dentro del tampón, y se hace pasar la aguja en dirección longitudinal hasta el otro extremo del tampón, mientras que se inyecta con lentitud. De este modo se ha logrado que el tampón esté humedecido a fondo de un modo uniforme. A continuación los tampones son secados por congelación así como envasados y conservados igual que bajo a).

La mezcla de reactivos puede ser aplicada fundamentalmente sobre cualquier soporte absorbente. Para la determinación del líquido vaginal o en la vagina se han acreditado como muy convenientes láminas transparentes, por ejemplo una lámina de acetato de celulosa, tal como es utilizada para fines de electroforésis, o el producto "Parafilm M" de la firma American Chemcompany. Junto al lugar en el que pasan a comunicación por colocación una sobre otra las láminas con LDH, tiene lugar una coloración en el sentido hacia el azul. Tales láminas tienen la ventaja de que son mecánicamente más resistentes que, por ejemplo, papel de filtro, y además de ello

para la estabilización o el archivo pueden ser hechas totalmente transparentes. Al mismo tiempo permanece totalmente inalterada la intensidad de color.

- 5 Como baños para producir transparencia para láminas de acetato de celulosa pueden utilizarse:
- a) Metanol: ácido acético glacial en la proporción 85:15;
 - b) Isobutanol: dioxano en la proporción de 1:1 hasta 3:7
 - c) Metiletilcetona: dioxano en la proporción 3:2
 - d) Acetato de etilo: dioxano en la proporción 3:2
 - 10 e) Metanol: ácido acético glacial: glicerina en la proporción 87:12:1

Para la lámina de Parafilm es apropiada una corta inmersión en solución al 7,5% de ácido acético.

15 También se puede llevar a cabo un tratamiento con aceites. Para ello son apropiados Whitmore-Oil 120 u Ondino-Oil 17 (Shell).

20 Estas láminas con una superficie de 1,5 a 2,0 cm² pueden ser utilizadas convenientemente por un médico especialista con una aplicación colposcópica sobre una alteración supuesta de las mucosas en la vagina. En el lugar en donde se encuentran acumulaciones de células que son tumorosas se produce en forma puntual una coloración, en lugar de producirse de un modo análogo al tampón.

25

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Republica Federal Alemana, el 12 Septiembre 1974, bajo el número P 24 43 741.0-52, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

REIVINDICACIONES

15

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:

20

1ª.- Procedimiento para la determinación en común de varias o de todas las isoenzimas de la lactatodeshidrogenasa, especialmente de las isoenzimas 4 o 5 solas o en mezcla entre sí o con otras isoenzimas de LDH, mediante reacción de lactato y nicotinamido-adenin-dinucleótido para formar piruvato, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo con un valor de pH específico para

25

10.9.75

el agente tamponador, especialmente de 6 a 6,5.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un medio fluido o líquido.

5 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo con un sistema tampón, en el cual el óptimo para la determinación se encuentra en el margen de pH ácido, con variación de la configuración de las isoenzimas.

10 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3ª, caracterizado porque la determinación se lleva a cabo en un sistema tamponador de trietanolamina-NaOH de pH 6 a 6,5, especialmente de 6,3 a 6,4.

15 5ª.- Procedimiento según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque tanto el líquido corporal a investigar como también el reactivo de ensayo o la combinación de ensayo, que se utilizan para la investigación, son ajustados a un valor de pH de 6,3 a 6,4.

20 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 5ª, caracterizado porque la combinación de ensayo es ajustada a un valor de pH tal que con un valor de pH propio del líquido corporal a investigar que se diferencie del pH 6 a 6,5, en el caso de la reacción de lactato y nicotinamido-adenin-dinucleótido para formar piruvato se pre

25

senta un pH de 6 a 6,5, especialmente de alrededor de 6,3 a 6,4.

5 7ª.- Procedimiento según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque en el reactivo de ensayo y/o en el líquido corporal a investigar se presenta una capacidad de tamponamiento suficiente para la conservación de un valor de pH de 6,3 a 6,4 durante la determinación.

10 8ª.- Procedimiento para la determinación en común de varias o de todas las isoenzimas de la lactato-deshidrogenasa.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 19.ENE.1977

P.A.

20

Alberto de Elzaburu

Por Poder



25

16.1.77

JMM/.