



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 988**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98966274 .7**

86 Fecha de presentación : **09.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1038024**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2000**

54 Título: **Reactivo estabilidad y método para determinar la creatinkinasa.**

30 Prioridad: **11.12.1997 DE 197 55 079**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**  
**Sandhofer Strasse 116**  
**68305 Mannheim, DE**

72 Inventor/es: **Nagel, Rolf;**  
**Mistele, Jürgen y**  
**Schröder, Norbert**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 287 988 T3

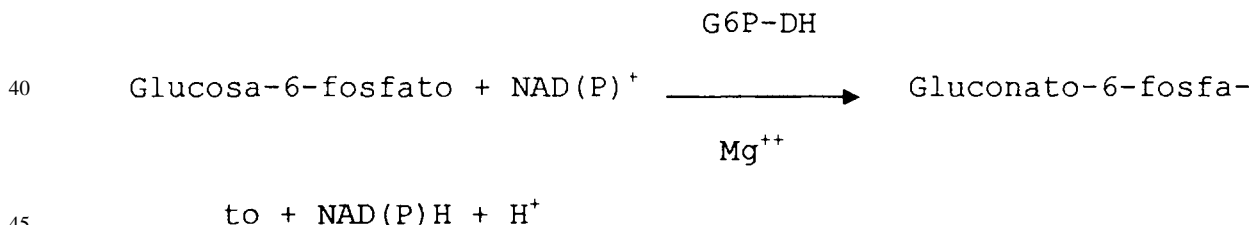
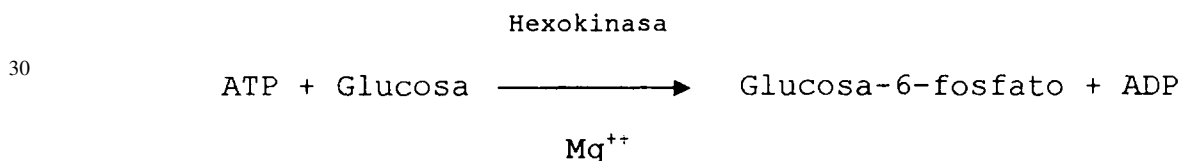
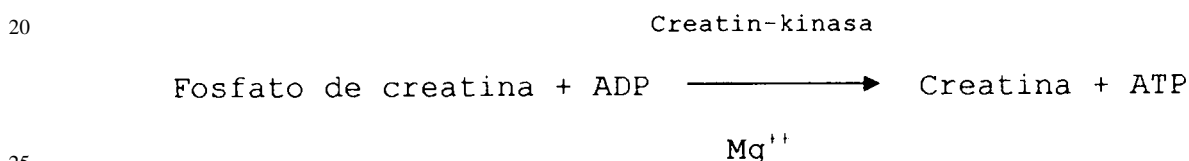
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Reactivo estabilizado y método para determinar la creatinkinasa.

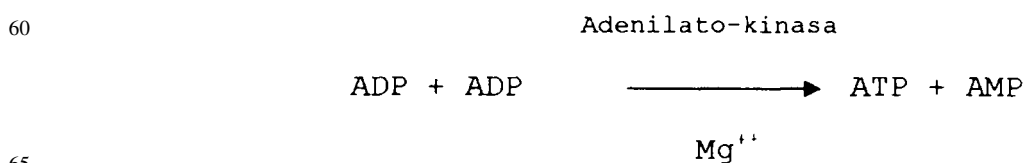
5 La presente invención se refiere a un método mejorado o bien a un reactivo estabilizado para la determinación fotométrica de la creatinkinasa en muestras biológicas, como el suero o el plasma sanguíneo del hombre. El reactivo se caracteriza básicamente porque al menos contiene una ditionita y/o una sal de sulfito de iones alcalinos o alcalinotérreos en una proporción estequiométrica.

10 La determinación de creatinkinasa en suero o plasma tiene un importante papel en el diagnóstico del infarto de miocardio. Como método estándar se emplea para ello una prueba fotométrica, en la cual en una reacción acoplada enzimática de fosfato de creatina y adenosin-5'-difosfato (ADP) se crea o fabrica la adenosin-5'-trifosfato (ATP) de creatina a través de la creatinkinasa (CK) contenida en la muestra; con la ATP se forma, por ejemplo, la glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa en presencia de la hexokinasa (HK), que es oxidada en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) con la transformación simultánea de NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> en NADH o NADPH y la creación de gluconato-6-fosfato:



50 Como parámetro de medición sirve el aumento de la extinción que tiene lugar por la formación de NAD(P)H, a una temperatura determinada, habitualmente entre 25 y 37°C, en un intervalo de tiempo predeterminado, que es proporcional a la actividad de la CK en el volumen de muestra. Para que la CK pueda desplegar toda su actividad enzimática, la determinación se realiza frecuentemente en presencia de activadores de la CK, por ejemplo, de los compuestos de tiol, como el glutatión, ditioneitol, tioglicerol, 2-mercaptoetanol y N-acetilcisteína.

55 Además se añaden al reactivo en el que se basa la prueba de la CK unos inhibidores para las miokinasas existentes eventualmente en la muestra (adenilato-kinasa), como por ejemplo, el adenosin-5'-monofosfato (AMP) y/o el diadenosin-pentafosfato. A pesar de estas adiciones la reacción puede transcurrir del modo siguiente:



## ES 2 287 988 T3

donde de ADP se forma ATP de forma no específica. Esto puede conducir a una formación de NAD(P)H que falsifica o mejor dicho falsea la determinación de CK. La alteración o el trastorno por una adenilato-kinasa parcialmente inhibida, que aparece especialmente en las muestras hemolíticas, puede ser eliminada de manera que antes del inicio propiamente de la reacción de la CK por la adición del fosfato de creatina se determina la actividad de la adenilato-kinasa y ésta es sustraída (lo que se conoce como “rate blanking”) de la actividad total (CK y adenilato-kinasa). Esencialmente se trata de que existan todos los componentes necesarios para la detección de la cantidad de ATP formada sobre el adenilato-kinasa en la primera solución de reacción (hasta el fosfato de creatina).

Para la determinación de las isoenzimas de creatin-kinasa se pueden añadir al reactivo además unos inhibidores específicos, como por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra determinadas isoenzimas CK.

Para aumentar la sensibilidad de detección la glucosa-6-fosfato puede contener además 6-fosfogluconolactonasa y gluconato-6-fosfato-deshidrogenasa; en este caso se sintetizarán dos moles de NADH o de NADPH por mol de ATP formado o de glucosa-6-fosfato (R. Vormbrock y R. Helger, Enzyme 38, Suppl. I(1987), págs. 20/21).

Además es posible, por ejemplo, realizar la detección de CK de forma que a partir del fosfato de creatina y de ADP el ATP formado por medio de glicerina y glicerokinasa, preferiblemente en presencia de iones de magnesio, sea transformado en glicerina-3-fosfato, el cual en presencia de oxígeno se transforme enzimáticamente en peróxido de hidrógeno y pueda ser detectado de forma convencional por medio de peroxidasa y de indicadores redox.

Fundamentalmente todos los componentes necesarios para la determinación de CK, es decir enzimas y sustratos, se presentan en un único reactivo. En particular en los analizadores se realiza preferiblemente la determinación de manera que la muestra es incubada previamente durante algunos minutos con un primer reactivo parcial que contiene además de fosfato de creatina todos los componentes requeridos para la reacción de detección y otros aditivos posibles, como por ejemplo la N-acetilcisteína, los inhibidores de adenilato-kinasa así como si es preciso inhibidores del isoenzima de la CK, y a continuación se inicia la reacción de detección mediante la adición de un segundo reactivo parcial que contiene básicamente fosfato de creatina en una solución tamponada.

Además de evitar una formación de NAD (P) H ocasionada por la CK en la fase de la activación del enzima que transcurre en presencia del compuesto de tiol añadido, además es posible de este modo evitar las falsificaciones del resultado de medición debidas a excesivas actividades en adenilato-kinasa que no son inhibidas por los insuficientes inhibidores de adenilato-kinasa, como por ejemplo, las que pueden aparecer en las muestras hemolíticas. Para ello tras la mezcla de la muestra y del primer reactivo parcial se realiza una primera medición de la velocidad de formación de NAD(P)H y el resultado se resta de la velocidad de formación del NAD(P)H tras la adición del segundo reactivo parcial que contiene fosfato de creatina.

Un inconveniente para el usuario de dichos reactivos reside en que ahora, en particular, los reactivos deben ser fabricados antes de su uso mediante la disolución de componentes sólidos, como por ejemplo, liofilizados, granulados o comprimidos y estos son estables pocos días o semanas en un almacenamiento en frío de 2 hasta 8°C. Por motivos de racionalización en un laboratorio clínico existe hoy en día la necesidad creciente de reactivos listos para el uso con una estabilidad de cómo mínimo 12 meses a 2 hasta 8°C. Este requisito no se puede cumplir actualmente por falta de estabilidad. En realidad la inestabilidad del reactivo utilizado es debida a la inestabilidad de la N-acetilcisteína (NAC, activador de CK).

El problema de la estabilidad se puede resolver ciertamente como en EP 0 686 561, mediante el almacenamiento de NAC (junto con NAD(P)) en una segunda solución a pH 3,0, sin embargo con grandes inconvenientes. En esta fórmula de reactivo la activación de la CK se lleva a cabo inicialmente con el inicio de la reacción de la CK. Para la medición libre de la fase de reposo se requiere por tanto un tiempo de espera elevado antes de iniciar la propia medición y se limita con ello la zona de medición del método. Otro inconveniente es que no es posible la eliminación de la alteración de adenilato-kinasa por el rate blanking. En la patente EP 0 774 514 se han descrito ciertamente medidas de estabilización para los correspondientes reactivos líquidos para determinar la CK, como por ejemplo, la adición de una fosfina y un compuesto de sulfhidrilo, por ejemplo, el ditiotreitol, el DTT. Sin embargo, la adición de DTT está ligada al inconveniente de que éste desestabiliza el enzima auxiliar G6P-DH y de ese modo la adición de otro componente en forma de un compuesto de hidroxilamina (como por ejemplo, el hidrocloreto de carboximetoxilamina) hace posible la estabilización de la G6P-DH (EP 0 640 686).

Además en EP 0 721 986 se han descrito unos reactivos estables para la determinación de la creatinquinasa, que contienen determinados compuestos SH como la tioglicerina (TG), el 2-mercaptoetanol (2ME) o bien el ácido 2-mercaptoetanosulfónico (2MES) en concentraciones molares. Contrariamente a otros activadores, estos no inhiben la actividad CK en forma oxidada. Las concentraciones relativamente elevadas de los compuestos SH correspondientes pueden provocar, no obstante, unos efectos secundarios no deseados, como por ejemplo, la inactivación de las enzimas auxiliares (por ejemplo, G6P-DH). Estos activadores no se recomiendan actualmente para la determinación de la actividad de la CK (por ejemplo, según 1fcC, DGkCh).

Es habitual que se comparen los sistemas de prueba correspondientes teniendo en cuenta los isoenzimas y las diferentes especies de CK.

## ES 2 287 988 T3

La técnica más indicada se ha descrito en JP-A-09-070298 y WO 95/30769. La JP-A-09-070298 publica el uso de un reactivo estabilizado, que contiene un oxácido con un átomo de azufre central en combinación con un compuesto que contiene un grupo tiol como activador de CK, para la determinación de la actividad de la CL. El reactivo puede constar de dos reactivos parciales, de manera que el oxácido existe o bien en el propio reactivo parcial como activador de la CK, o en ambos reactivos parciales. La utilización del oxácido como estabilizador en uno de los reactivos parciales, en el que no contiene activador de CK, no se ha publicado.

La WO 95/30769 describe el uso de los compuestos orgánicos del sudor, el sulfóxido de dimetilo, la dimetiltiourea, N-2-mercaptopropionilglicina y el glutatión para la estabilización de una solución reactivo para determinar la CK. La solución contiene un compuesto que tiene un grupo tiol, por ejemplo, la A-acetilcisteína (NAC) como activador. Sin embargo, no se prefiere un compuesto sulfurado como estabilizador sino manitol en concentraciones de hasta 5 mM.

En especial para poder racionalizar los trabajos en un laboratorio clínico bajo una presión económica creciente, existe actualmente cada día más la necesidad de reactivos estabilizados, que sean estables y puedan ser almacenados en forma líquida durante al menos 12 meses a 2 hasta 8°C, sin que sea preciso calibrarlos y donde el riesgo de reacciones poco específicas debido a determinados aditivos sea mínimo.

Este cometido se resuelve conforme a la invención mediante un reactivo, definido en la reivindicación 1, que contiene un sistema tampón adecuado, unos sustratos que son transformados por la CK o bien los coenzimas correspondientes, un activador de CK así como los componentes necesarios para una o varias reacciones enzimáticas y al menos una ditionita y/o una sal de sulfito de los iones alcalinos o alcalinotérreos de carga molar respecto al activador de CK. Los activadores de CK son conocidos por el técnico. De acuerdo con la invención se prefiere un reactivo que contenga adenosin-5'-difosfato (ADP) y fosfato de creatina como sustratos transformables por la CK. Se prefiere especialmente un reactivo, que contenga glucosa, un enzima que forme glucosa-6-fosfato, como por ejemplo hexokinasa, ADP, fosfato de creatina, un activador de CK, si se diera el caso el adenosin-5'-monofosfato, una coenzima en forma oxidada, como la NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> o derivados de este tipo, una G6P-deshidrogenasa y si se diera el caso uno o varios inhibidores de adenilato-kinasa y/o activadores y al menos una ditionita y/o una sal de sulfito de iones alcalinos o alcalinotérreos en una relación estequiométrica. Se prefieren especialmente las sales disódicas para la estabilización de reactivos para la determinación de CK.

La concentración en el reactivo de los componentes sulfurosos conforme a la invención es del orden del enzima que va a ser determinado (CK) y es como máximo de 20 mmol/l. Se prefieren concentraciones entre aproximadamente 0,01 y 5 mmol/l, especialmente de 0,1 hasta 1,0 mmol/l de componentes sulfurosos.

Todos los componentes restantes así como otros aditivos si fuera preciso, que incluyen la 6-fosfogluconolactonasa y la gluconato-6-fosfato-deshidrogenasa, se emplearán en las concentraciones habituales.

Existe una configuración especial del reactivo conforme a la invención que es cuando los componentes correspondientes para la determinación de CK se presentan por separado en dos reactivos parciales, de manera que en un primer reactivo parcial se encuentra el activador de la CK y todo el conjunto de sustancias y enzimas necesarias para la determinación de la CK hasta el fosfato de creatina y en un segundo reactivo parcial se encuentra el fosfato de creatina y por ejemplo glucosa. El componente sulfurado conforme a la invención se encuentra por tanto en un segundo reactivo parcial y no en el primer reactivo parcial. Se ha comprobado que se prefiere que el compuesto de azufre se añada al primer reactivo más complejo, el cual contiene también activador de CK, justo directamente antes de la medición, por ejemplo, sobre la segunda solución reactivo.

Otra configuración especial de la reacción será un reactivo que contenga glucosa en una concentración baja en la combinación de NAD (P)<sup>+</sup>G6P-DH en un reactivo parcial, preferiblemente en una proporción de unos 5 mmol/l o menos, mientras se prefieren 0,5 hasta 1,0 mmol/l de glucosa.

El reactivo acuoso conforme a la invención se caracteriza por una estabilidad especial después de un periodo de almacenamiento largo entre 2 y 8°C, es decir después de un periodo de tiempo de varios meses de hasta 12 meses sin una nueva calibración y se caracteriza por una elevada especificidad. En la prueba de la función de la CK se podía constatar únicamente una desviación mínima frente a un reactivo recién fabricado, es decir, los índices de recuperación de la CK eran aproximadamente del 100%.

Otro objetivo de la invención es un método para la determinación enzimática de la creatin-kinasa en un material de ensayo biológico utilizando el reactivo anteriormente especificado.

### Leyendas a las figuras

Figura 1: Determinación de la actividad de la CK añadiendo Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0 hasta 4 mmol/l); tiempo de almacenamiento: 14 días, temperatura: 35°C en comparación a 2 hasta 8°C.

Figura 2: Influencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0 hasta 4 mmol/l) en la G6P-DH; tiempo de almacenamiento: 14 días, temperatura: 35°C en comparación a 2 hasta 8°C.

## ES 2 287 988 T3

Figura 3: Determinación de la actividad de la CK añadiendo  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (1 mmol/l); tiempo de almacenamiento: 192 días, temperatura: 2 hasta 8°C (2 muestras).

5 Figura 4: Influencia de diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 20 mmol/l) en la actividad de la CK; Temperatura: 2 hasta 8°C.

Figura 5: Influencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (1 mmol/l) en comparación a DTT (10 mmol/l) en la G6P-DH; tiempo de almacenamiento: 136 días, temperatura: 2 hasta 8°C.

10 Los ejemplos siguientes aclaran la invención:

### Ejemplo 1

15 *Determinación de CK en presencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$*

#### *Composición de reactivos*

20	Reactivo 1 (R1):	Imidazol (pH 6,6)	100 mmol/l
		Glucosa	1 mmol/l
		Acetato de magnesio	10 mmol/l
		EDTA	2 mmol/l
		ADP	2 mmol/l
25		AMP	5 mmol/l
		Di-adenosin-pentafosfato	10 $\mu\text{mol/l}$
		NADP <sup>+</sup>	2 mmol/l
		N-acetilcisteína	20 mmol/l
30		Hexokinasa	3 U/ml
		G6P-deshidrogenasa	3 U/ml
		$\text{Na}_2\text{SO}_3$	0 hasta 4 mmol/l
35	Reactivo 2 (R2):	Capso (pH 9,3)	20 mmol/l
		Glucosa	110 mmol/l
		Fosfato de creatina	170 mmol/l

40 Para la determinación se mezclan 250  $\mu\text{l}$  de R1 con 10  $\mu\text{l}$  de muestra, se incuban durante 5 minutos, se inicia la reacción con 50  $\mu\text{l}$  de R2 y se mide la actividad de la CK tras otra incubación de 1 minuto. La determinación de la actividad enzimática, de la CK o bien G6P-Dh se realizaba tras el almacenamiento a 2 hasta 8°C o bien 35°C en momentos diferentes (tablas 1-3, figuras 1-3).

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 287 988 T3

## TABLA 1

Influencia de la cantidad de sulfito en la estabilidad de la función de la CK (0 hasta 4 mmol/l de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> en el reactivo 1) conforme al ejemplo 1

Sulfito (mmol/l)	Muestra	14 días de almacenamiento a		
		2 hasta 8°C (U/l)	35°C (U/l)	(%)
0	1	270	240	88,9
1	1	278	267	96,0
2	1	274	265	97,0
3	1	271	267	98,5
4	1	260	272	104,4

## TABLA 2

Sulfito (mmol/l)	14 días de almacenamiento a		
	2 hasta 8°C (U/l)	35°C (U/l)	(%)
0	4,01	1,44	35,9
1	3,95	1,50	38,1
2	3,92	1,57	39,9
3	3,98	1,69	42,5
4	4,06	1,76	43,5

ES 2 287 988 T3

TABLA 3

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

Prueba de la función de estabilidad a largo plazo CK (0 a 1 mmol/l Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> en reactivo 1) conforme ejemplo 1					
Días 2 hasta 8°C	Muestra	0 mmol/l sulfito		1 mmol/l sulfito	
		(U/l)	(%)	(U/l)	(%)
0	1	290	100,0	296	100,0
27	1	284	97,8	289	97,6
55	1	288	99,4	292	98,8
85	1	281	97,0	291	98,4
114	1	279	96,2	288	97,3
136	1	272	93,7	287	97,0
192	1	269	92,8	288	97,3
220	1	264	91,0	282	95,4
308	1	242	83,4	293	99,1
345	1	237	81,7	291	98,4
451	1	203	70,0	274	92,7
0	2	562	100,0	566	100,0
27	2	553	98,4	561	99,1
55	2	550	97,9	563	99,4
85	2	550	97,8	561	99,0
114	2	539	95,8	550	97,1
136	2	531	94,4	558	98,5
192	2	523	93,0	559	98,6
220	2	508	90,4	549	96,9
308	2	465	82,7	563	99,4
345	2	450	80,1	558	98,5
451	2	402	71,5	539	95,2

## ES 2 287 988 T3

### Ejemplo 2

#### *Influencia de la cantidad de sulfito en la actividad de CK*

- 5 La composición del reactivo y la realización de la prueba tenían lugar en principio análogamente al ejemplo 1. Variaba únicamente la cantidad de sulfito sódico (0 hasta 20 mmol/l) que se añadía al reactivo 1. El resultado se extrae de la tabla 4 o bien de la figura 4.

TABLA 4

10

15

20

25

30

35

40

Influencia de la cantidad de sulfito en la función de la CK (0 hasta 20 mmol/l de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> en el reactivo 1)				
Sulfito (mmol/l de prueba)	Muestra 1		Muestra 2	
	(U/l)	(%)	(U/l)	(%)
0	236	100,0	529	100,0
1	242	102,9	530	100,2
2	239	101,4	520	98,4
3	236	100,3	514	97,2
4	227	96,4	496	93,8
5	215	91,3	504	95,3
10	196	83,2	464	87,7
20	182	77,3	441	83,3

### Ejemplo 3

- 45 *Estabilidad del reactivo en presencia del ditioneitol (DTT) (situación de la técnica)*

#### *Composición del reactivo*

50

55

60

Reactivo(R):	Imidazol (pH 6,6)	100 mmol/l
	Glucosa	1 mmol/l
	Acetato de magnesio	10 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l
	ADP	2 mmol/l
	AMP	5 mmol/l
	Di-adenosin-pentafosfato	10 μmol/l
	NADP <sup>+</sup>	2 mmol/l
	N-acetilcisteína	20 mmol/l
	Hexokinasa	3 U/ml
	G6P-deshidrogenasa	3 U/ml
	Ditioneitol	10 mmol/l

- 65 El reactivo R se describía en el ejemplo 1, se purificaba con la muestra a medir y se determinaban las actividades enzimáticas correspondientes (tabla 5, figura 5).

# ES 2 287 988 T3

TABLA 5

Estabilidad a largo plazo del G6P-Dh (10 mmol/l DTT en comparación a 1 mmol/l de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , ejemplo 1)						
Días 2 hasta 8°C	Sin ejemplo 1		1 mmol/l sulfito Ejemplo		10 mmol/l DTT Ejemplo 3	
	U/ml	%	U/ml	%	U/ml	%
0	3,84	100,0	3,68	100,0	4,67	100,0
55	3,46	90,3	3,65	99,2	2,81	60,2
85	3,51	91,4	3,77	102,3	2,69	57,6
114	3,16	82,4	3,57	96,9	2,07	44,4
136	3,03	78,9	3,35	91,0	1,55	33,1
192	2,64	68,8	3,15	85,5	0,52	11,1
220	2,34	60,4	3,12	84,7	0,29	6,2
308	1,55	40,4	2,98	80,9	-	-
345	1,60	41,7	2,65	72,0	-	-
451	0,96	25,0	2,12	57,6	-	-

## Ejemplo 4

### Regeneración de CK en el reactivo 1

#### Composición del reactivo

Reactivo 1(R1):	Imidazol (pH 6,6)	100 mmol/l
	Glucosa	1 mmol/l
	Acetato de magnesio	10 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l
	ADP	2 mmol/l
	AMP	5 mmol/l
	Di-adenosin-pentafosfato	10 μmol/l
	NADP <sup>+</sup>	2 mmol/l
	N-acetilcisteina	20 mmol/l
	Hexokinasa	3 U/ml
	G6P-deshidrogenasa	3 U/ml
Reactivo 2(R2)	Capso (pH 9,3)	20 mmol/l
	Glucosa	110 mmol/l
	Fosfato de creatina	170 mmol/l
	N <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	10 mmol/l

Mezcla de R1, R2 y la muestra correspondiente y la determinación siguiente se realizaba conforme al ejemplo 1.

# ES 2 287 988 T3

## TABLA 6

Regeneración de CK en R1 por la adición de sulfito a R2					
R1	R2	Muestra 1	Muestra 2	Recuperación	
Carga 14 días	Sulfito (mmol/l)	(U/l)	(U/l)	Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)
Reactivo	Nuevo (ref.)	236	513		
2-8°C	0	228	494	96,6	96,2
	10	238	509	100,8	99,5
35°C	0	179	382	75,8	74,4
	10	227	486	96,2	94,7

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Reactivo para la determinación de creatinkinasa en un material de muestras biológico que consta de dos reactivos  
parciales, de manera que un primer reactivo parcial contiene los sustratos y coenzimas apropiados que pueden ser  
transformados por la CK, un activador de la CK y opcionalmente otros componentes que se requieren para una o  
más reacciones posteriores en un medio tamponado acuoso, que se **caracteriza** porque el segundo pero no el primer  
reactivo parcial contiene una sal de ditionita y/o una sal de sulfito de iones alcalinos o alcalinotérreos donde la sal de  
ditionita y/o de sulfito está presente en una cantidad submolar respecto a dicho activador de CK.
- 10 2. Reactivo conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque el segundo reactivo parcial contiene un  
máximo de 20 mmol/l de una sal de ditionita y/o de sulfito de iones alcalinos o alcalinotérreos.
- 15 3. Reactivo conforme a la reivindicación 1 ó 2, que se **caracteriza** porque el reactivo contiene glucosa, fosfato de  
creatina, G6P deshidrogenasa, adenosin-5'-difosfato, un enzima que forma la glucosa-6-fosfato,  $\text{NAD}^+$  ó  $\text{NADP}^+$  y  
uno o más inhibidores de adenilato kinasa.
- 20 4. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, donde el primer reactivo parcial contiene glucosa, G6P  
des- hidrogenasa, adenosin-5'-difosfato, una hexokinasa,  $\text{NAD}^+$  ó  $\text{NADP}^+$  y un activador de CK y el segundo reactivo  
parcial contiene fosfato de creatina y al menos una sal de ditionita y/o de sulfito de iones alcalinos o alcalinotérreos.
5. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones 3 ó 4, que se **caracteriza** porque la concentración máxima de  
glucosa es de 5 mmol/l.
- 25 6. Método para la determinación enzimática de creatinkinasa en material de prueba biológico usando un reactivo  
conforme a las reivindicaciones 1 a 5.

30

35

40

45

50

55

60

65

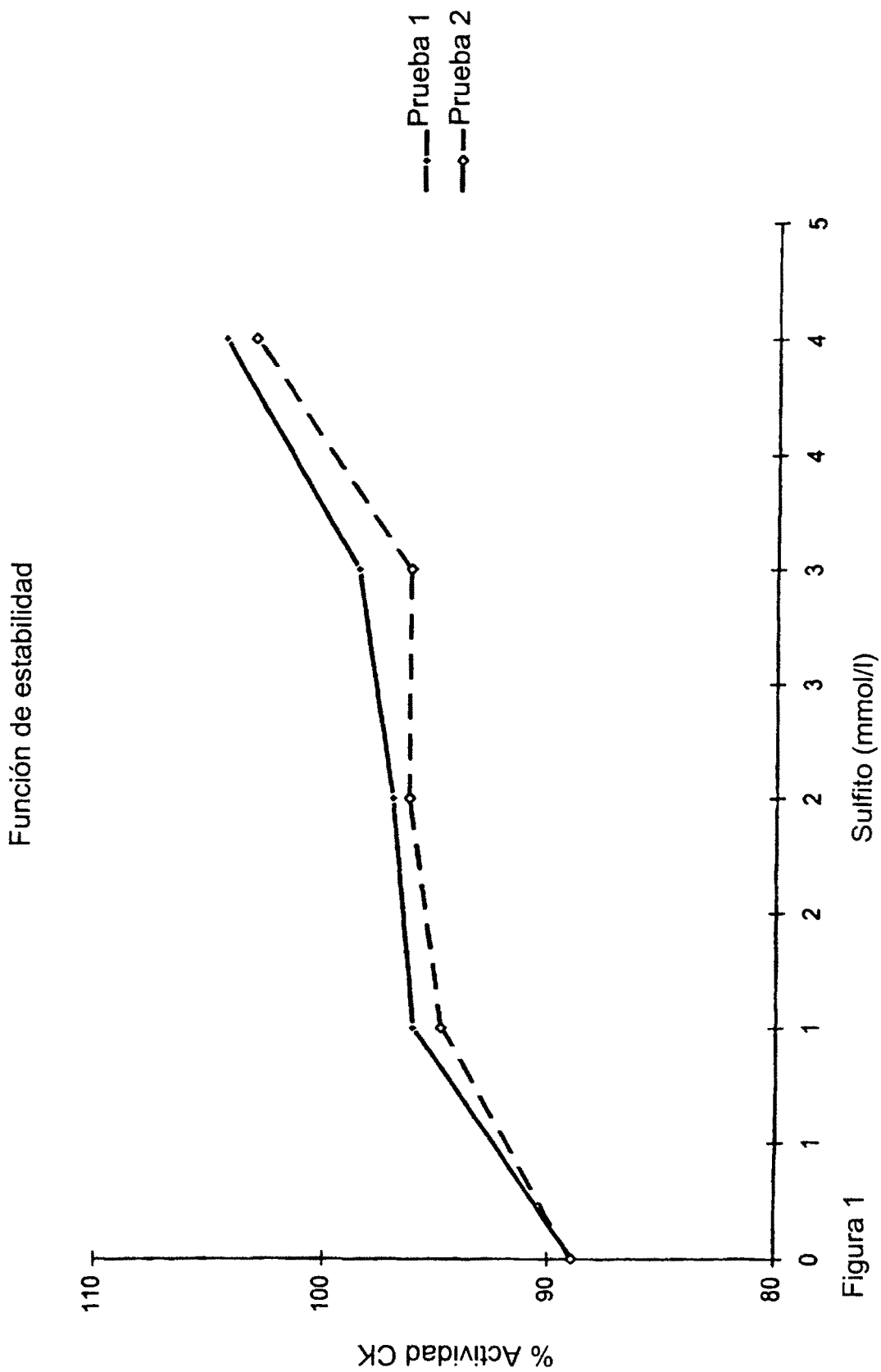
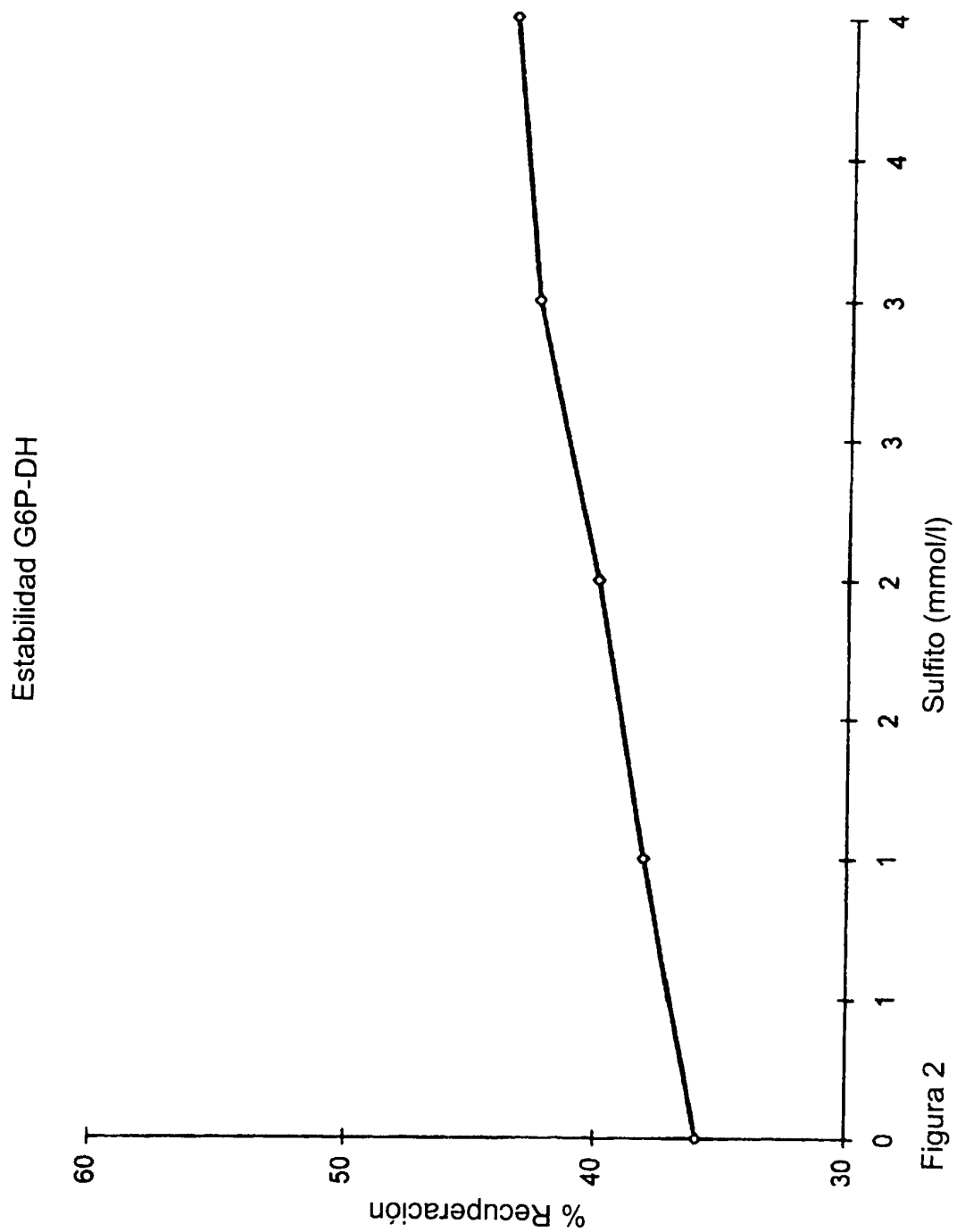


Figura 1



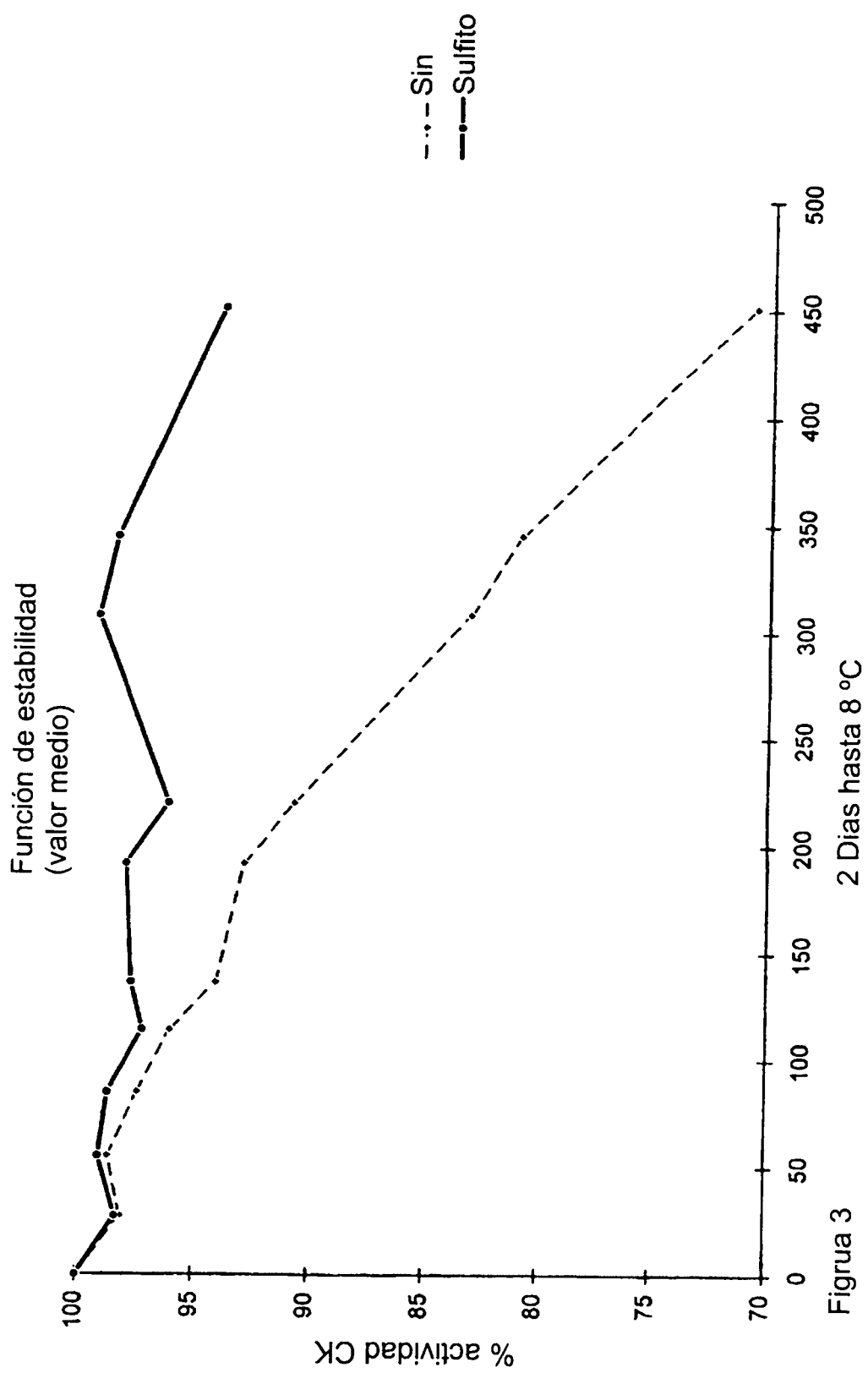


Figura 3

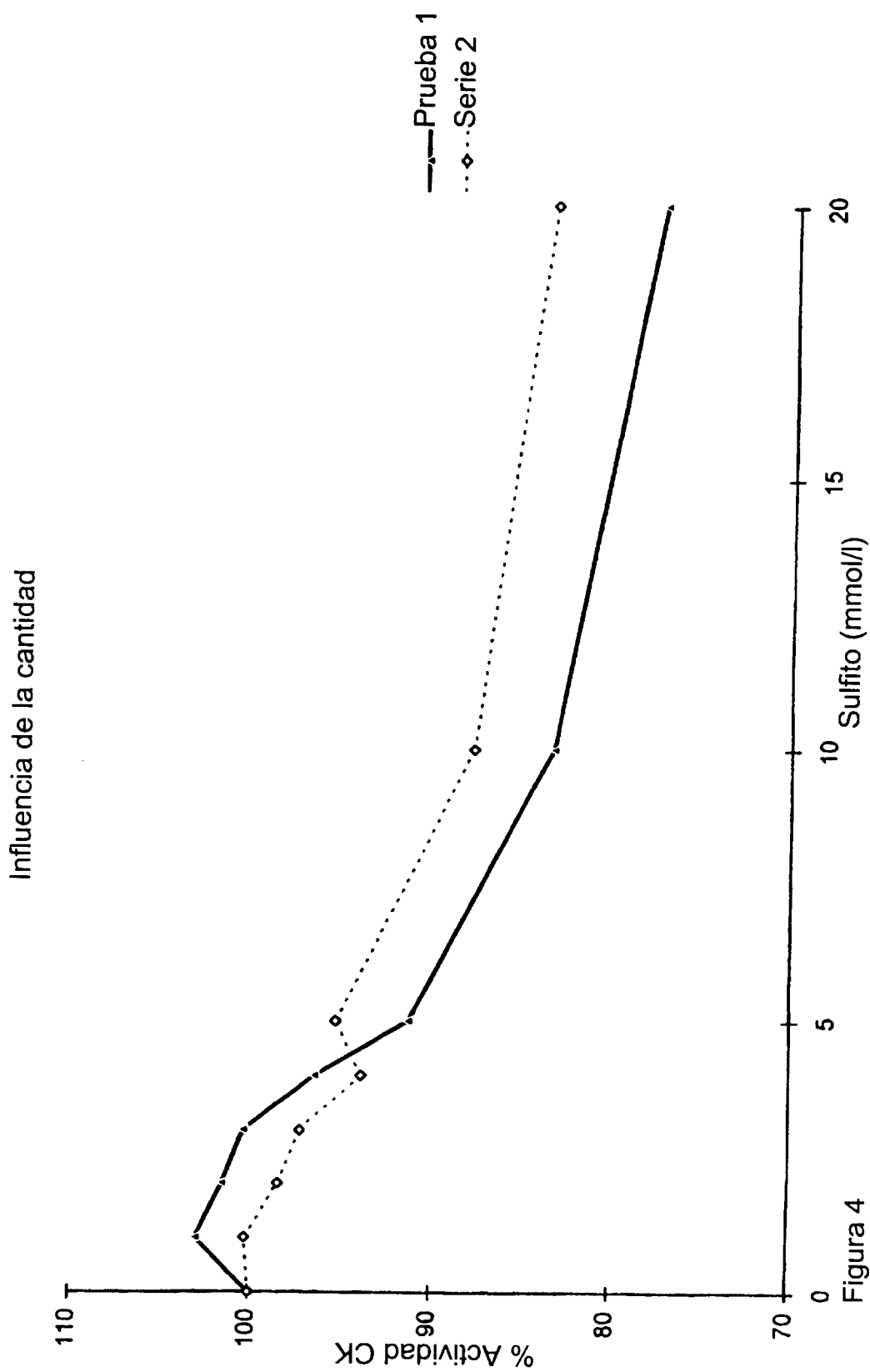


Figura 4

