



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 210**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05748372 .9**

96 Fecha de presentación : **09.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1756298**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Diagnóstico y pronóstico de la infección de una herida mediante la medición de una fosfolipasa A₂ en fluido de herida.**

30 Prioridad: **11.06.2004 GB 0413078**
08.11.2004 US 625830 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.08.2010

73 Titular/es:
Systagenix Wound Management IP Co. B.V.
WTC, Tower B, 11th Floor, Strawinskylaan 1135
1077 XX Amsterdam, NL

72 Inventor/es: **Shah, Faraia;**
Clark, Rachael;
Trotter, Patrick, John;
Watt, Paul, William y
Cullen, Breda, Mary

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 344 210 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

Diagnóstico y pronóstico de la infección de una herida mediante la medición de una fosfolipasa A₂ en fluido de herida.

La presente invención se refiere al diagnóstico y pronóstico de infecciones de heridas, mediante el ensayo del fluido de una herida para la presencia de un marcador que se encuentra presente en una cantidad que es indicativa de una condición inflamatoria. El marcador es una fosfolipasa A₂ de elevado peso molecular (cPLA₂).

En mamíferos, una lesión desencadena una compleja cascada organizada de sucesos celulares y bioquímicos que resulta en una herida cicatrizada. La cicatrización de heridas es un proceso dinámico complejo que resulta en la restauración de la continuidad y función anatómicas; una herida idealmente cicatrizada es una herida que ha vuelto a su estructura, función y apariencia anatómicas normales.

Todas las heridas crónicamente contaminadas contienen una flora bacteriana del tejido. Estas bacterias pueden ser autóctonas del paciente o pueden ser exógenas a la herida. El cierre, o finalmente la cicatrización de la herida, con frecuencia se basa en la capacidad del médico de controlar el nivel de dicha flora bacteriana. La infección de heridas por bacterias retrasa el proceso de cicatrización, debido a que las bacterias compiten para la obtención de los nutrientes y el oxígeno con los macrófagos y fibroblastos, la actividad de los cuales resulta esencial para la cicatrización de la herida. Resulta una infección cuando las bacterias consiguen dominar los factores sistémicos y locales de la resistencia del huésped. Por lo tanto, la infección es una manifestación de la alteración del equilibrio huésped/bacterias en favor de las bacterias invasoras. Esto induce una respuesta séptica sistémica, y también inhibe los múltiples procesos implicados en la cicatrización de las heridas. Finalmente, la infección puede resultar en una etapa inflamatoria prolongada y, de esta manera, en una cicatrización lenta, o puede provocar la necrosis posterior de la herida. La etapa de granulación del proceso de cicatrización únicamente se iniciará tras ceder la infección.

En la práctica clínica, un diagnóstico de infección se basa en la presencia de dolor local, calor, hinchazón, supuración y enrojecimiento, aunque muchos indicadores clínicos, tales como la inflamación y la supuración, presentan un valor de predicción reducido de infección de una herida. El diagnóstico definitivo se alcanza mediante el análisis microbiológico de muestras procedentes de la herida. La biopsia del tejido proporciona los resultados más exactos, aunque es un procedimiento invasivo que resulta difícil de realizar debido a la masa de espécimen que resulta necesaria. La aplicación de un apósito en la herida es el método de muestreo de heridas más común utilizado en el Reino Unido, aunque se ha cuestionado su valor clínico. Además, el diagnóstico microbiológico de la infección de heridas puede tardar 48 a 72 horas, lo que permite que la infección se desarrolle adicionalmente en el caso de que no se aplique inmediatamente un tratamiento de primera línea/de mejor predicción.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de la técnica de un método para el diagnóstico y pronóstico precoces de la infección de una herida, y de dispositivos y vendas para heridas de utilización en la práctica de dichos métodos.

Los cPLA₂ son enzimas que hidrolizan la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidónico. Por lo tanto, la actividad de estas enzimas resulta importante en la producción de eicosanoides (por ejemplo prostaglandinas y leucotrienos) y por lo tanto se asocian a inflamación y a los mecanismos de defensa del huésped. Puede encontrarse una revisión detallada en Kudo y Murakami, Prostaglandins and other Lipid Mediators 68-69:3-58, 2002.

Existen esencialmente dos grupos de PLA₂: PLA₂ de elevado peso molecular (PLA₂ citosólico) y PLA₂ de bajo peso molecular (PLA₂ soluble). El cPLA₂ citosólico de elevado peso molecular normalmente se localiza intracelularmente y por lo tanto no se esperaría su presencia en los fluidos de una herida. Existen tres isoformas de este cPLA₂: α (1.110 kDa), β (85 kDa) y γ (60 kDa) (ver Kudo y Murakami, 2002). Los PLA₂ solubles de bajo peso molecular (sPLA₂) es conocido que actúan intracelularmente y, en contraste con cPLA₂, los presentes inventores no han encontrado ninguna evidencia de que la forma de bajo peso molecular (sPLA₂) se encuentre a nivel elevado en el fluido de heridas infectadas.

La patente WO n° 03/101487 describe un método para evaluar la enfermedad inflamatoria neural en un animal mediante la determinación del nivel de la proteína fosfolipasa A₂ (incluyendo cPLA₂) en un tejido o líquido corporal, tal como sangre, plasma y líquido cerebroespinal. Aparentemente no contiene enseñanza o sugerencia de la asociación de cPLA₂ con líquido extracelular de una herida o como marcador de infección bacteriana.

La patente WO n° 00/54052 describe un ensayo para la detección de cPLA₂ en glóbulos rojos o sobre los mismos, en particular para el diagnóstico de enfermedades en las que se encuentra implicada una disfunción de los sistemas de señalización celular en los que participan ácidos grasos altamente insaturados. Esta referencia aparentemente no contiene enseñanza ni sugerencia del ensayo de líquido extracelular para la presencia de cPLA₂ en el diagnóstico de una infección de una herida.

Funakoshi *et al.*, Pancreas 6(5):588-594, 1991, dan a conocer que los niveles séricos de PLA₂ se encuentran elevados en los sueros de pacientes con enfermedades pancreáticas y que la medición de PLA₂ sérico resulta útil para el diagnóstico y el seguimiento de la pancreatitis. No contiene enseñanza ni sugerencia de ninguna asociación de cPLA₂ con líquido extracelular de una herida o como marcador de la infección bacteriana de una herida.

Abdul N. Hamood *et al.*, Journal of Surgical Research 61(2):425-432, 1996, describe la producción de factores extracelulares de virulencia, incluyendo la fosfolipasa C, por aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de infecciones traqueales, del tracto urinario y de heridas.

5 El documento WO n° A-9505479 describe un nuevo ensayo para la actividad de cPLA₂. No contiene sugerencia de la aplicación del ensayo a fluido de una herida.

10 El documento WO n° A-03040406 describe la utilización de un fragmento de fibronectina, una proteasa de neutrófilo, o una proteasa de macrófago, como marcador de infección bacteriana en fluido de una herida.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico o prognosis de una infección de una herida, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra de fluido de una herida que ha sido extraído del cuerpo, para la presencia o nivel de cPLA₂.

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sistema para la utilización en el diagnóstico y tratamiento de heridas, que comprende: una venda o un biosensor de heridas que comprende componentes de un sistema de ensayo para someter a ensayo los fluidos de una herida para la presencia o nivel de cPLA₂, y una venda para heridas que comprende por lo menos un agente antimicrobiano, para la aplicación en la herida en el caso de que la presencia o nivel medido de cPLA₂ sea indicativo de infección de la herida, en el que dicho sistema de ensayo comprende una
20 pareja de unión inmunológica para el cPLA₂.

La presente invención se refiere a un marcador de inflamación/infección que podría utilizarse como molécula diana en un nuevo ensayo diagnóstico/de prognosis (por ejemplo en el laboratorio o en el sitio de atención al paciente) para identificar una condición inflamatoria, tal como una infección. El marcador es una fosfolipasa A₂ de elevado peso
25 molecular (cPLA₂).

El análisis de transferencia western de fluidos de heridas procedente de pacientes infectados y no infectados muestra que se observa cPLA₂ y fragmentos de cPLA₂ (se encuentran presentes tres bandas) en el fluido de la herida infectada (IV 13) y que no se observa ninguna inmunorreactividad contra cPLA o contra fragmentos de cPLA₂ en el
30 fluido de la herida no infectada (ver la figura 1, adjunta). Basándose en la especificidad del anticuerpo y en el peso molecular, se cree que las tres bandas observadas corresponden a: cPLA₂α (110 kDa), cPLA₂β (85 kDa) y cPLA₂γ (60 kDa).

cPLA₂ normalmente actúa intracelularmente y no se encuentra normalmente presente en el ambiente de una herida. Por lo tanto, la observación de que se encuentran presentes isoformas de esta proteína en el fluido de una herida infectada pero no en el fluido de una herida no infectada es nueva e inesperada. Se cree que los datos proporcionados en la presente memoria representan la primera demostración de que la forma citosólica de PLA₂ se encuentra presente
35 incluso en fluido de heridas.

El resultado de que cPLA₂ se encuentra presente en líquido infectado implica que la diferenciación entre niveles infectados y basales resulta significativa. Por lo tanto, podría utilizarse cPLA₂ como un marcador de condiciones inflamatorias, tales como la infección, y podrían incorporarse componentes para detectar o medir las mismas en cualquier tipo de kit diagnóstico/de prognosis (de laboratorio (por ejemplo ELISA) o en el punto de atención al paciente (por ejemplo un kit basado en anticuerpos similar a los kits de embarazo comercialmente disponibles).
40

El ensayo del fluido de heridas puede ser cualitativo. Alternativamente, puede llevarse a cabo un ensayo cuantitativo o semicuantitativo para el marcador (es decir, cPLA₂). De esta manera, en una realización se mide la concentración del marcador.

50 El método se lleva a cabo en fluido de herida que ha sido extraído del cuerpo (por ejemplo en forma de torunda clínica o de una muestra de fluido).

Pueden utilizarse diversos métodos para detectar o medir la concentración del marcador. Entre los métodos adecuados se incluyen la utilización de reacciones químicas o ligadas a enzima, o técnicas de tipo inmunológico (por ejemplo ELISA, transferencias western), espectrofotométrico, colorimétrico, fluorimétrico o de detección de radioactividad. En una realización, se proporciona un ensayo de tipo tira reactiva. Este tipo de ensayo podría ser utilizado por la comunidad médica y por el paciente, permitiendo un diagnóstico/prognosis más fácil y más precoz.
55

Por ejemplo, en el caso de las heridas superficiales expuestas, puede aplicarse una torunda clínica, una venda, una "tira reactiva" u otro dispositivo biosensor directamente sobre la superficie de la herida. El dispositivo debería contener los componentes del sistema de ensayo para detectar el marcador, de manera que la reacción de ensayo puede producirse *in situ*. Seguidamente, el dispositivo puede extraerse de la herida y medirse la señal por un medio apropiado. En muchos casos, el médico puede no requerir una evaluación exacta de la concentración precisa del marcador, sino que únicamente podría desear conocer si existe una concentración suficiente del marcador para justificar una acción
60 profiláctica o curativa. En estos casos, la evaluación visual de la venda puede resultar suficiente para permitir la identificación de las áreas específicas de infección. De esta manera puede evitarse el tratamiento innecesario de tejido de granulación sano.

ES 2 344 210 T3

Una venda que permita la localización de las áreas infectadas de una herida resultará preferible en determinados casos. Las vendas de mapeado diagnóstico de heridas que podrían adaptarse a los métodos de la presente invención se describen en el documento GB n° A-2323166.

5 La inmovilización de componentes de reacción sobre una tira reactiva, venda de mapeado de heridas u otro sustrato sólido o de gel ofrece la oportunidad de realizar una medición más cuantitativa. Por ejemplo, en el caso de una reacción ligada a la generación de un color, el dispositivo puede transferirse a un espectrómetro. Los métodos adecuados de análisis resultarán evidentes para el experto en la materia.

10 La inmovilización de los componentes de reacción en un pequeño dispositivo biosensor también presentará la ventaja de que resultará necesaria una menor cantidad de los componentes (tales como anticuerpo, enzima y sustrato). De esta manera, el dispositivo resultará menos caro de fabricar que una venda que requiera una mayor superficie para permitir el mapeado de un área de herida grande.

15 Los métodos para la incorporación de los componentes de la reacción de ensayo sobre una venda clínica, "tira reactiva", venda diagnóstica u otro biosensor son rutinarios de la técnica (ver, por ejemplo, Fägerstam y Karlsson, *Immunochemistry*, 949-970, 1994).

20 Convenientemente, los métodos utilizan una pareja de unión inmunológica para cPLA₂. Este tipo de sistema de ensayo se utiliza en el sistema de la presente invención. Entre las parejas de unión inmunológica adecuadas se incluyen anticuerpos, incluyendo anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Entre los anticuerpos que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen anticuerpo policlonal contra el extremo C-terminal de PLA₂ (abcam 9014) y el anticuerpo monoclonal contra cPLA₂, n° de cat. US Biological P4074-0, y se encuentran disponibles comercialmente. La pareja de unión inmunológica puede inmovilizarse o unirse a un sustrato sólido en un dispositivo tal como se describe en la presente memoria.

25 La señal detectable producida por el dispositivo es observable o medible utilizando un medio físico, químico o biológico conocido por el experto en la materia. Una señal detectable puede ser un cambio de la emisión o absorbancia de ondas electromagnéticas a una longitud de onda determinada, o una reacción de hibridación o enzimática. En realizaciones preferentes, las señales detectables son cambios de color observados bajo luz blanca, o fluorescencia observada bajo luz UV. En determinadas realizaciones, el dispositivo puede comprender un sensor electrónico, por ejemplo para detectar un cambio de color o fluorescencia, y para proporcionar un resultado cuantitativo del mismo. El dispositivo puede incluir un sensor electrónico que puede proporcionar un resultado cuantitativo en forma digital.

35 El dispositivo puede comprender además un elemento de ensayo de referencia para determinar el contenido total de proteínas de la muestra, de manera que el nivel medido de cPLA₂ puede normalizarse a un nivel constante total de proteínas con el fin de incrementar la exactitud.

40 En determinadas realizaciones, el dispositivo para la utilización en la presente invención comprende o consiste esencialmente de una venda para heridas, tira reactiva o torunda. En determinadas realizaciones, el dispositivo comprende una carcasa que contiene uno o más reactivos y que está dotada de una entrada para la introducción de la muestra. La carcasa puede ser por lo menos parcialmente transparente, o puede disponer de ventanas en la misma, para la observación de una región indicadora que experimenta un cambio de color o de fluorescencia. En determinadas realizaciones, el dispositivo funciona bajo el principio del flujo lateral. Es decir, dicho dispositivo comprende una carcasa que presenta una entrada para la muestra y paredes laterales que definen un camino de fluido de flujo lateral que se extiende desde la entrada. La expresión "flujo lateral" se refiere a flujo de líquido en el que los componentes disueltos de la muestra son transportados, preferentemente a tasas sustancialmente iguales, y con un flujo relativamente no alterado, lateralmente a través del portador. Convenientemente, el camino de flujo de fluido contiene uno o más materiales de portador poroso. Los materiales de portador poroso preferentemente se encuentran en comunicación de fluidos a lo largo de sustancialmente la totalidad del camino de flujo fluido, de manera que ayudan a la transferencia del fluido a lo largo del camino mediante acción capilar. Convenientemente, los materiales de portador poroso son hidrofílicos, aunque preferentemente ellos mismos no absorben agua. Los materiales de portador poroso pueden funcionar como sustratos sólidos para la unión de reactivos o grupos indicadores. En determinadas realizaciones, el dispositivo comprende además un grupo de control situado en una zona de control en dicho dispositivo, en la que el grupo de control puede interactuar con un componente de la muestra de fluido de herida para mejorar la precisión del dispositivo.

55 El tamaño y forma del portador no resultan críticos y pueden variar. El portador define un camino de flujo lateral. Convenientemente, el portador poroso presenta la forma de una o más tiras alargadas o de columnas. En determinadas realizaciones, el portador poroso es una o más tiras alargadas de material de hoja, o una pluralidad de hojas que combinadamente forman una tira alargada. En este caso normalmente se espaciarían una o más zonas de reacción o de detección a lo largo del eje longitudinal de la tira. Sin embargo, en algunas realizaciones el portador poroso podría presentarse, por ejemplo, en otras formas de hoja, tal como de disco. En estos casos, las zonas de reacción y de detección normalmente se dispondrían concéntricamente en torno al centro de la hoja, con una zona de aplicación de la muestra en el centro de la hoja. En todavía otras realizaciones, el portador está formado de perlas portadoras, por ejemplo perlas fabricadas de cualquiera de los materiales indicados anteriormente. Las perlas convenientemente pueden presentar un tamaño de entre aproximadamente 1 micrómetro y aproximadamente 1 mm. Las perlas pueden empaquetarse en el camino de flujo en el interior de la carcasa, o pueden capturararse o soportarse sobre un sustrato poroso adecuado, tal como una almohadilla de fibra de vidrio.

Se apreciará que los dispositivos para la utilización en la presente invención pueden adaptarse para detectar por lo menos un analito además de cPLA₂. Esto puede llevarse a cabo mediante la utilización de varios reactivos diferentes en una única zona de reacción, o preferentemente mediante la provisión en un único dispositivo de una pluralidad de caminos de flujo lateral, cada uno adaptado para detectar un analito diferente. En determinadas realizaciones, se define la pluralidad de caminos de flujo lateral en forma de caminos de flujo de fluido separados dentro de la carcasa, por ejemplo la pluralidad de caminos de flujo lateral puede distribuirse radialmente en torno a una abertura receptora de muestra. En algunas realizaciones, en la pluralidad de caminos de flujo de fluido, estos se encuentran físicamente separados por la carcasa. En otras realizaciones, pueden definirse múltiples caminos de flujo lateral (carriles) en una única membrana de flujo lateral mediante la deposición de líneas de cera o de material hidrofóbico similar entre los carriles.

Los dispositivos para la utilización en la presente invención pueden incorporarse, por ejemplo, en un dispositivo de detección bacteriana del tipo siguiente.

Brevemente, los dispositivos son sensores de flujo lateral para la detección de un enzima proteasa endógena y/o microbiana en fluidos de heridas con el fin de determinar la cantidad y tipo de la infección bacteriana. Los dispositivos comprenden: una carcasa que presenta una entrada para la muestra y paredes laterales que definen un camino de flujo de fluido que se extiende desde la entrada, un grupo indicador que se encuentra unido a un sustrato sólido por medio de un grupo peptídico linker que puede ser cortado por el analito enzima, estando localizado el sustrato sólido en una zona de reacción del camino de flujo de fluido, y un grupo detector localizado en una zona de detección más abajo de la zona de reacción en el camino de flujo de fluido, en el que el grupo detector puede interactuar con un grupo indicador que ha sido cortado del sustrato sólido para producir un cambio detectable en la zona de detección.

Puede incluirse convenientemente un elemento absorbente en los dispositivos para la utilización en la presente invención. El elemento absorbente es un medio para pasar la totalidad de la muestra a través del dispositivo mediante atracción capilar. Generalmente, el elemento absorbente consiste de un material absorbente hidrofílico, tal como un material textil tejido o no tejido, un papel de filtro o un filtro de fibra de vidrio.

El dispositivo puede comprender además por lo menos un elemento de filtración para eliminar impurezas de la muestra antes de que ésta se someta a análisis. El dispositivo de filtración puede comprender, por ejemplo, una hoja microporosa de filtración para la eliminación de células y otros residuos particulados de la muestra. El dispositivo de filtración típicamente está dotado más arriba de la zona de aplicación de la muestra del camino de flujo de fluido, por ejemplo en la entrada de la carcasa o en la carcasa más arriba de la entrada.

Preferentemente, los dispositivos para la utilización en la presente invención incluyen un grupo de control en una zona de control del dispositivo, en los que el grupo de control puede interactuar con un componente de la muestra de fluido de herida para mejorar la precisión del dispositivo. Convenientemente, la zona de control está adaptada para reducir los resultados falsos positivos o falsos negativos. Un resultado falso negativo podría aparecer por diversos motivos, incluyendo: (1) la muestra se encuentra excesivamente diluida, o (2) la muestra inicialmente era excesivamente pequeña.

Con el fin de solucionar el mecanismo de falsos negativos, la zona de control preferentemente comprende además un elemento de ensayo de referencia para determinar el contenido total de proteasa o el contenido total de proteínas de la muestra, es decir, para establecer que el contenido total de proteasa o el contenido total de proteínas de la muestra es más alto que un mínimo predeterminado. Resulta posible indicar la presencia de proteínas mediante la utilización de azul tetrabromofenol, que cambia de incoloro a azul dependiendo de la concentración de la proteína presente. También resulta posible detectar glucosa (utilizando glucosa oxidasa), sangre (utilizando dihidroperóxido de diisopropilbenceno y tetrametilbencidina), leucocitos (utilizando éster y sal diazonio). Todos ellos pueden resultar analitos útiles para la detección en la zona de control para la reducción de falsos negativos.

La presente invención puede utilizar un sistema de ensayo diagnóstico o kit que comprende un dispositivo diagnóstico tal como se ha indicado anteriormente. El sistema de ensayo o kit puede comprender, además de un dispositivo diagnóstico, uno o más componentes seleccionados de entre: un gráfico de colores para interpretar el resultado del dispositivo diagnóstico, un dispositivo de muestreo para recoger una muestra de fluido de herida procedente de una herida, un líquido de lavado para transportar una muestra de fluido de herida a través del dispositivo, y una solución de tratamiento previo que contiene un reactivo para el tratamiento previo de la muestra de fluido de la herida.

En caso de encontrarse presente, el dispositivo de muestreo puede comprender una torunda o una pinza para biopsia, por ejemplo un eje que presenta una torunda o una pinza para biopsia unida al mismo. Convenientemente, el dispositivo diagnóstico incluye una abertura receptora de muestra, y preferentemente la abertura receptora de muestra y la torunda o pinza para biopsia comprenden elementos de ajuste complementarios en los que la torunda o pinza para biopsia pueden fijarse al dispositivo con la torunda o pinza para biopsia alojadas en la abertura receptora de muestra.

En determinadas realizaciones, el elemento fijador en el eje puede localizarse entre 1 mm y aproximadamente 30 mm de la base de la torunda o de la pinza para biopsia. Esto es consistente con la utilización de una abertura receptora de muestra relativamente pequeña en la carcasa del dispositivo diagnóstico. La abertura receptora de muestra típicamente se localiza en una superficie superior del dispositivo diagnóstico, y típicamente presenta generalmente la forma de un tubo que se proyecta hacia arriba, abierto en la parte superior y en el que el camino de flujo de fluido se encuentra situado en el fondo del tubo.

ES 2 344 210 T3

El elemento fijador en el eje puede presentar una región cónica del eje para formar un ajuste de interferencia con la carcasa, por ejemplo puede presentar la apariencia de un cono truncado que es coaxial al eje y que se estrecha hacia el primer extremo del eje. Alternativamente, el eje completo puede presentar un diámetro mayor que el de la torunda o pinza para biopsia, con una región cónica contigua al primer extremo. En cualquier caso, el diámetro de la región cónica que encaja con la carcasa normalmente es mayor que el diámetro de la torunda o de la pinza para biopsia, de manera que la abertura de entrada puede alojar la torunda o pinza para biopsia.

En otras realizaciones, el elemento de acoplamiento puede comprender una proyección de ajuste por presión para formar un ajuste por presión con una o más proyecciones complementarias en una superficie interior de la carcasa, o una proyección roscada para formar un ajuste roscado con una o más roscas complementarias en una superficie interior del tapón, o un ajuste de tipo cerrojo Luer.

La torunda puede ser cualquier torunda absorbente, por ejemplo una torunda fibrosa no tejida. Típicamente, el diámetro de la torunda es de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 mm, por ejemplo de aproximadamente 3 mm. En determinadas realizaciones, la torunda puede formarse a partir de una espuma de celda abierta médicamente aceptable, por ejemplo una espuma de poliuretano, debido a que dichas espumas presentan una elevada capacidad de absorción y pueden exprimirse fácilmente para expulsar los fluidos absorbidos. La pinza para biopsia típicamente es una pinza cilíndrica de acero inoxidable de diámetro comprendido entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 10 mm, por ejemplo de entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 8 mm, convenientemente de aproximadamente 6 mm.

En determinadas realizaciones el eje es hueco, en donde puede pasarse un fluido por el eje desde el segundo extremo para expulsar la muestra biológica de la torunda o de la pinza para biopsia hacia el interior del dispositivo diagnóstico. Lo anterior ayuda a garantizar que la totalidad de la muestra pasa a través del dispositivo, evitando de esta manera falsos negativos. El eje puede comprender un ajuste en el segundo extremo para la unión de una jeringa u otra fuente de fluido. En determinadas realizaciones, el aparato puede comprender un reservorio de líquido unido al segundo extremo del eje, por ejemplo una perilla compresible que contiene el líquido, que puede activarse tras la utilización de la torunda o pinza para biopsia. Se describen dispositivos adecuados de este tipo en, por ejemplo, el documento US nº A-5266266. En otras realizaciones, el aparato puede comprender un émbolo que puede empujarse por el orificio hueco del eje para expulsar fluido u otros especímenes de la torunda o de la pinza para biopsia.

Otra ventaja del eje hueco es que, en el caso de que el aparato sea una pinza para biopsia, la muestra de biopsia puede empujarse o soplar de la pinza con mayor facilidad. El aparato de pinza para biopsia puede comprender además una herramienta homogeneizadora que puede pasarse por el eje hueco para homogeneizar una muestra de tejido en la pinza para biopsia. Tras esta etapa de homogeneización puede pasarse, en caso necesario, un líquido por el eje desde el segundo extremo para expulsar el tejido homogenizado de la pinza para biopsia hacia el interior del dispositivo para el análisis diagnóstico.

La torunda o pinza para biopsia puede esterilizarse y puede empaquetarse en un recipiente impermeable a microorganismos. Los dispositivos diagnósticos para la utilización en la presente invención también pueden esterilizarse, aunque pueden no esterilizarse, debido a que los dispositivos con frecuencia no entran en contacto con el paciente que se diagnostica.

La concentración del marcador también puede medirse en un sistema de ensayo acuoso. Por ejemplo, puede extraerse fluido de la herida directamente del ambiente de la herida, o puede lavarse de la herida utilizando un tampón de solución salina. La solución resultante seguidamente puede someterse a ensayo para la concentración del marcador en, por ejemplo, una probeta o en una placa de microensayo.

Dicho método resultará preferible para la utilización en casos en los que la herida es excesivamente pequeña o excesivamente inaccesible para permitir el acceso de un dispositivo diagnóstico/de prognosis, tal como una tira reactiva. Este método presenta la ventaja adicional de que la muestra de exudado de la herida puede diluirse.

Resultará evidente que un sistema de ensayo acuoso resulta más aplicable a la utilización en un ambiente de laboratorio, mientras que una venda para herida que contenga los componentes de reacción necesarios resultará más adecuada para la utilización en un hospital o en un ambiente doméstico.

En determinadas realizaciones según dicho aspecto, el método se adapta para determinar si la presencia o el nivel de cPLA₂ en una muestra de fluido de herida excede un nivel mínimo predeterminado que es característico de una infección. En otras realizaciones, el método se adapta para determinar si la presencia o el nivel de cPLA₂ en una muestra de fluido de herida muestra un incremento con el tiempo que es indicativo del desarrollo de una infección.

Preferentemente, el sistema según la presente invención comprende además una venda para herida sustancialmente libre de agentes antimicrobianos, para la aplicación en la herida en el caso de que la presencia o nivel medido de cPLA₂ sea indicativo de una herida no infectada. El sistema puede presentarse en la forma de un kit, y el dispositivo y la venda o vendas para herida pueden empaquetarse conjuntamente en un único paquete.

La invención puede evitar la aplicación innecesaria de agentes antimicrobianos en la herida, lo que resulta deseable debido a que la mayoría de los agentes antimicrobianos son citotóxicos e interfieren con la cicatrización de la herida, y también con el fin de evitar el desarrollo de microorganismos resistentes.

- 5 La venda para herida antimicrobiana utilizada en el presente aspecto de la invención comprende una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano, que preferentemente puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de antisépticos y antibióticos y mezclas de los mismos. Entre los antibióticos adecuados se incluyen los antimicrobianos peptídicos (por ejemplo defensinas, magainina, derivados sintéticos de los mismos), tetraciclina, penicilinas, terramicinas, eritromicina, bacitracina, neomicina, polimicina B, mupirocina, clindamicina y mezclas de los mismos. Entre los antisépticos
10 adecuados se incluyen sulfadiazina de plata, clorhexidina, yoduro de povidona, triclosán, otras sales de plata y plata coloidal, sucralfato, sales de amonio cuaternario y mezclas de los mismos.

- Los materiales de vendas para heridas utilizados en el presente aspecto de la invención pueden proporcionarse, por ejemplo, en forma de perlas, hojuelas, polvos y preferentemente en forma de una película, almohadilla fibrosa, malla,
15 tejido tejido o no tejido, esponja liofilizada, espuma o de combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el material de la venda se selecciona de entre el grupo que consiste de tejidos tejidos, tejidos de punto y tejidos no tejidos, la totalidad de los cuales puede fabricarse mediante métodos convencionales. En otras realizaciones, el material puede comprender (o consistir esencialmente) de una esponja liofilizada o de una esponja secada con solvente.

- 20 El material de la venda para herida puede encontrarse en forma de un sólido, o de una pomada semisólida o gel. Preferentemente el material de la venda para herida comprende únicamente hasta 20% en peso, preferentemente menos de 10% en peso de agua. El contenido relativamente reducido de agua mejora la estabilidad del material y permite esterilizar por calor o irradiación sin pérdida de actividad. El material también puede contener entre 0% y 40% en peso, preferentemente entre 0% y 25% en peso de un plastificante, preferentemente un alcohol polihídrico, tal
25 como glicerol. La totalidad de los porcentajes anteriormente indicados se expresan en peso seco.

- Cualquier tipo de herida puede diagnosticarse o tratarse utilizando los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la herida puede ser una herida aguda, tal como una laceración traumática aguda, quizás resultante de una incisión operatoria intencionada. Más habitualmente, la herida puede ser una herida crónica. Preferentemente, la herida
30 crónica se selecciona de entre el grupo que consiste de úlceras venosas, úlceras de presión, úlceras por decúbito, úlceras diabéticas y úlceras crónicas de etiología desconocida. La presente invención puede utilizarse en el diagnóstico o pronóstico de animales mamíferos humanos y no humanos.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fluido de herida” pretende referirse al exudado secretado o descargado por células en el ambiente de la herida. La expresión “fluido de herida” en la presente memoria se refiere a cualquier exudado u otro fluido de herida (preferentemente que sustancialmente no incluya sangre) que se retira de la superficie de la herida mediante aspiración, absorción o lavado. La expresión “fluido de herida” no se refiere normalmente a sangre o plasma tisular situado lejos del sitio de la herida.

- 40 Mediante el ensayo de fluido de herida para la presencia o nivel de cPLA₂, los presentes inventores incluyen el ensayo de cPLA₂ α , cPLA₂ β o cPLA₂ γ .

Breve descripción de los dibujos

- 45 La figura 1 muestra los resultados de una transferencia western para cPLA₂ en fluido de herida infectado y no infectado. Fluido NV e IV diluido 1:10.

Modos de poner en práctica la invención

- 50 Ejemplo 1

Recolección y tratamiento de fluido de herida; retirada de fluido de herida infectado y no infectado

- 55 Todos los pacientes alistados en el estudio presentaban úlceras venosas de las piernas de por lo menos 30 días de duración y un área superficial de por lo menos 1 cm². Los pacientes se diagnosticaron como “no infectados”, de apariencia normal de la herida o “infectados” basándose en un mínimo de 4 indicios y síntomas clínicos indicativos de infección. Se excluyeron pacientes del estudio en el caso de que se observase hueso con osteomielitis positiva. Entre otros criterios de exclusión se incluían condiciones o tratamientos concomitantes que podrían haber interferido con la cicatrización de la herida y una historia de no cumplimiento que haría improbable que el paciente completase
60 el estudio. Se recolectaron fluidos de herida de los pacientes tras obtener el consentimiento informado de todos los pacientes o de representantes autorizados. El protocolo fue autorizado por el comité ético en el centro de estudio participante previamente al inicio del estudio. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas.

- 65 *Preparación de las muestras*

Se determinó el contenido total de proteínas en cada muestra de fluido de herida extraída utilizando el ensayo de proteínas de Bradford, siguiendo las instrucciones del fabricante para la utilización de un kit de ensayo de proteínas

Bio-Rad. A continuación, todas las muestras no infectadas se codificaron como NV seguido de un número específico, y las muestras infectadas se codificaron como IV seguido de un número. Se diluyeron 1:5 y 1:10 en PBS muestras lavadas y después se mezclaron mediante pipeteado con tampón de tratamiento reducido (20 μ l de fluido de herida mezclados con 5 μ l de tampón de tratamiento reducido) y después se sometieron a ebullición durante 5 minutos en un baño de agua para degradar las proteínas hasta fragmentos y producir muestras reducidas (nota: los tubos Eppendorf deben dejarse abiertos). Tras este tratamiento, se congelaron todas las muestras a -20°C hasta la realización de los análisis de transferencia western.

Transferencias western

Se utilizó fluido de herida procedente de un paciente no infectado, identificado como NV12, y del paciente infectado IV13. Se utilizó marcador de SDS-PAGE de amplio rango (número de catálogo 161-0318, obtenido de Biorad) como estándar y geles de Tris-HCl al 10%. Se cargaron las muestras en el gel y se llevó a cabo electroforesis en SDS-PAGE a 60 mA hasta que las muestras habían corrido hasta el fondo del gel. Se transfirieron los geles a papel de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,45 μ m (Biorad) a 200 mA durante 3 horas bajo inmersión en hielo. Tras la transferencia del gel, se lavó el papel de nitrocelulosa en solución de PBS/Tween al 0,1% durante 5 minutos y después se bloquearon en leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), bajo agitación. Tras un lavado adicional en solución de PBS/Tween, se trató un filtro con anticuerpo primario (un anticuerpo policlonal Abcam 9014) diluido en solución de PBS/Tween como control. Se dejaron ambos filtros en el agitador durante la noche a temperatura ambiente. Se obtuvo el anticuerpo policlonal primario de Autogen Bioclear UK (sc20105) a una concentración de 200 μ g/ml y se diluyó (100 μ l puros añadidos a 9.900 μ l de solución de PBS/Tween). Tras la incubación con el anticuerpo primario, los filtros se lavaron cada 5 minutos en solución de PBS/Tween durante 30 minutos y después se trataron con anticuerpo secundario (anticuerpo antioveja ligado a HRP obtenido de Sigma) durante 1 hora a RT bajo agitación. A continuación, se revelaron los filtros utilizando el kit Opti4 CN (Biorad) durante 5 a 10 minutos y se observaron las bandas.

Datos adicionales

La figura 1 muestra información de un paciente infectado de un paciente no infectado. Para confirmar esta observación, se evaluaron los fluidos de heridas de cinco pacientes no infectados (NV2, 5, 9, 12 y 14) y de cinco pacientes infectados (IV 1, 4, 10, 13 y 22) utilizando el método descrito anteriormente.

Estos resultados demuestran que no se observó cPLA₂ en los pacientes no infectados y que cPLA₂ se encontraba presente en 4 de entre los cinco pacientes infectados. Este experimento adicional confirmó que cPLA₂ es un marcador de la infección de una herida.

Se entenderá que la invención ha sido descrita mediante ejemplos únicamente y que pueden realizarse modificaciones sin apartarse del alcance de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

5 1. Método de diagnóstico o pronosis de una infección de una herida, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra de fluido de herida que ha sido extraído del cuerpo, para la presencia o nivel de la fosfolipasa citosólica A₂ (cPLA₂).

2. Método según la reivindicación 1, en el que cPLA₂ es cPLA₂α, cPLA₂β o cPLA₂γ.

10 3. Sistema para la utilización en el diagnóstico y tratamiento de heridas, que comprende:

una venda para herida o un biosensor que comprende componentes de un sistema de ensayo para someter a ensayo un fluido de una herida para la presencia o el nivel de cPLA₂, y

15 una venda para herida que comprende por lo menos un agente antimicrobiano para la aplicación en la herida en el caso de que la presencia o el nivel medido de cPLA₂ sea indicativo de infección de la herida,

en el que dicho sistema de ensayo comprende una pareja de unión inmunológica para cPLA₂.

20 4. Sistema según la reivindicación 3, que comprende además una venda para herida sustancialmente libre de agentes antimicrobianos, para la aplicación en la herida en el caso de que la presencia o el nivel de cPLA₂ sea indicativo de una herida no infectada.

FIG. 1

