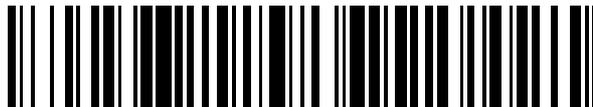


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 720**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11713086 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2548031**

54 Título: **Marcadores moleculares para infecciones de las vías urinarias**

30 Prioridad:

18.03.2010 IT RM20100121

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

12.08.2014

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**GIUNTA, FRANCESCO;
FORFORI, FRANCESCO y
SERI, GIADA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 484 720 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

Marcadores moleculares para infecciones de las vías urinarias.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar los niveles de procalcitonina en el plasma y la orina como marcador de diagnóstico para identificar pacientes con infecciones de las vías urinarias, a procedimientos *in vitro* para llevar a cabo dicha determinación, a un kit para el diagnóstico de pacientes con infecciones de las vías urinarias y a la utilidad de la procalcitonina en el diagnóstico de las infecciones de las vías urinarias.

10

Técnica anterior

15 Las infecciones de las vías urinarias (UTI) son un problema muy habitual, a menudo asociado al uso de un catéter urinario (Hooton T.M. *et al*, Clin Infect Dis., 1 de marzo de 2010, 50 (5):625-63) y normalmente están causadas por bacterias saprofitas presentes en el intestino y los genitales externos, y, menos habitualmente, por hongos y virus. En determinadas condiciones, estos organismos pueden colonizar las vías urinarias hasta llegar a la vejiga a través de la uretra. Desde el punto de vista clínico, las infecciones urinarias presentan como síntomas fiebre, disuria, estranguria, frecuencia urinaria, urgencia urinaria y leve dolor lumbar.

20 Los síntomas clínicos no siempre son suficientes para proporcionar un diagnóstico, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos, donde a menudo los pacientes no pueden comunicar sus síntomas y diversas comorbilidades pueden enmascarar el origen preciso de la infección.

25 Por consiguiente, es necesario llevar a cabo pruebas de laboratorio tanto para aislar los patógenos responsables como para evaluar las posibles complicaciones e identificar los tratamientos específicos.

30 La técnica preferida para diagnosticar las infecciones de las vías urinarias es el cultivo de orina. Esta prueba permite aislar la bacteria responsable de la infección y evaluar su sensibilidad o resistencia a los antibióticos mediante un antibiograma. El tiempo necesario para obtener los resultados del cultivo varía entre las 24 y las 48 horas, dependiendo de la especie microbiana de que se trate.

35 A la espera de los resultados, a menudo se lleva a cabo un tratamiento empírico, basado únicamente en la observación clínica, que puede conllevar un uso inapropiado de una terapia con antibióticos y a la realización en los pacientes de cultivos de orina completamente innecesarios (negativos).

En Nanda *et al*, Biomarker Insights (2009), volumen 4, páginas 111-121, se evalúa la procalcitonina sérica como marcador de infecciones de las vías urinarias.

40 En consecuencia, es sumamente importante identificar nuevas herramientas para el diagnóstico precoz de las UTI que sean capaces de predecir posibles complicaciones y mejorar los resultados, sobre todo en determinadas situaciones "difíciles", tales como en los recién nacidos o pacientes críticamente enfermos.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* y a la utilización de un kit para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias. La invención que se describe en el presente documento se basa en el descubrimiento de que la concentración de procalcitonina en las muestras de orina de los pacientes tiene un valor predictivo para el diagnóstico de las infecciones de las vías urinarias. Además, los presentes inventores también han observado que, en los pacientes que presentan infecciones de las vías urinarias, la concentración de procalcitonina en la orina es superior a la concentración de procalcitonina en el plasma, mientras que, en los pacientes que no presentan ninguna infección de las vías urinarias, la concentración de procalcitonina en la orina es inferior a la concentración de procalcitonina en el plasma. La determinación de la concentración de procalcitonina en la orina se puede utilizar para diagnosticar la presencia de una infección de las vías urinarias, ya sea comparando el valor de la concentración en la orina de los pacientes con valores estándar y/o en función de la relación entre la concentración de procalcitonina en el plasma y la concentración de procalcitonina en la orina.

60 Por consiguiente, el objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias, que incluye una etapa en la que se determina la concentración de procalcitonina en la muestra de orina de un paciente.

El objeto de la presente invención es también el procedimiento mencionado anteriormente, que incluye además una etapa en la que también se determina la concentración de procalcitonina en el plasma de dicho paciente.

65 El objeto de la presente invención es también la utilización de un kit para el diagnóstico y/o la monitorización y/o la evaluación *in vitro* de la gravedad de las infecciones de las vías urinarias, que incluye alícuotas de los reactivos

necesarios para determinar la concentración de procalcitonina en una muestra de orina y, opcionalmente, una muestra de plasma.

5 El objeto de la presente invención es también la utilización de la procalcitonina para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias utilizando muestras de orina.

10 La presente invención presenta la ventaja de que es capaz de diagnosticar y/o monitorizar a un paciente que presenta una infección de las vías urinarias utilizando un procedimiento muy sencillo y no agresivo, además de más rápido que los que se utilizan en la técnica, conocidos como cultivo de orina. Las ventajas, características y métodos de utilización de la presente invención se desprenden de la siguiente descripción detallada de algunas formas de realización, que se exponen a modo de ejemplo y sin limitación alguna.

Descripción detallada de las figuras

15 Figura 1. Población con cultivo de orina positivo. Esta figura muestra los valores de PCTur (procalcitonina urinaria) y PCTpl (procalcitonina plasmática) de 10 pacientes con alguna infección de las vías urinarias.

20 Figura 2. Población con cultivo de orina negativo. Esta figura muestra los valores de PCTur (procalcitonina urinaria) y PCTpl (procalcitonina plasmática) de 10 pacientes sin ninguna infección de las vías urinarias.

Las figuras 1 y 2 ponen de manifiesto que los valores de PCTur son mayores que los valores de PCTpl en 9 de 10 casos en la población con cultivo urinario positivo, y en ninguno de los pacientes pertenecientes a la población con cultivo urinario negativo.

25 Descripción detallada de la invención

La presente descripción da a conocer un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias. El método según la presente invención hace posible diagnosticar y/o monitorizar las infecciones de las vías urinarias. El procedimiento según la presente invención hace posible el diagnóstico de la presencia o ausencia de infecciones de las vías urinarias, la evaluación (diagnóstico) de la gravedad de la infección con respecto a una única determinación (es decir, cuanto mayor es la concentración de procalcitonina, más grave es la infección, estratificación del riesgo en la primera determinación) y la monitorización del progreso de la infección durante su tratamiento.

35 En la presente descripción, el término "infección de las vías urinarias" se refiere a la invasión de las vías urinarias, que normalmente se encuentra en condiciones estériles, por parte de gérmenes (bacterias, hongos y/o virus) en una cantidad suficiente para provocar la respuesta inflamatoria del urotelio.

40 Entre los ejemplos de microorganismos que pueden provocar infecciones de las vías urinarias se encuentran *E. coli*, *Proteus Mirabilis*, *E. faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Candida albicans*, etc. Los datos epidemiológicos indican que, en un tercio de los casos, las infecciones de las vías urinarias están asociadas al uso de un catéter urinario. La presente invención se puede aplicar a los pacientes portadores de dispositivos médicos urinarios permanentes o temporales (catéteres, nefrostomía, cistostomía) y a los pacientes de todas las edades no portadores de dichos dispositivos.

45 El procedimiento según la presente invención incluye una etapa en la que se determina la concentración de procalcitonina en la muestra de orina de un paciente. La procalcitonina (PCT) es el precursor de la calcitonina, una hormona responsable de la homeostasis del calcio producida por las células C neuroendocrinas medulares del tiroides.

50 Ventajosamente, el procedimiento según la presente invención incluye una etapa adicional en la que también se determina la concentración de procalcitonina en una muestra de plasma de dicho paciente. La determinación de la procalcitonina no sólo en la orina, sino también en el plasma, puede diagnosticar con mayor precisión la presencia o ausencia de una infección de las vías urinarias en los pacientes cuya orina y cuyo plasma se han analizado. De hecho, el estudio clínico llevado a cabo por los presentes inventores ha puesto de manifiesto que, en todos los pacientes con infecciones de las vías urinarias, el valor de la procalcitonina en la orina es mayor que en el plasma, mientras que dicho valor es menor en los pacientes con resultado negativo. Esta forma de realización se puede utilizar, por ejemplo, en pacientes cuyos valores de procalcitonina urinaria no son suficientes para indicar la presencia o ausencia de una infección de las vías urinarias, o en pacientes que presentan un cuadro clínico complejo (por ejemplo, la posible presencia tanto de una infección de las vías urinarias como de una infección sistémica).

55 En general, para determinar la concentración de procalcitonina en la orina y/o en el plasma, cualquier método conocido por los expertos en la materia que permita la determinación de la concentración de procalcitonina en un fluido biológico puede considerarse adecuado para los fines de la presente descripción. Por ejemplo, inmunoensayos comerciales cuantitativos y semicuantitativos como quimioluminiscencia LUMItest® PCT, LIAISON®,

5 BRAHMS PCT[®], TRACE: KRYPTOR[®], BRAHMS PCT, PCT[®]-Q. Las condiciones de ensayo se pueden modificar para evitar posibles interferencias provocadas por componentes de la matriz de orina.

10 La concentración de procalcitonina en la muestra de orina y/o de plasma que se pretende someter a ensayo se determina mediante la incubación de la muestra a una temperatura adecuada y durante un período adecuado con un anticuerpo primario específico para la procalcitonina suspendido en una concentración adecuada y en un tampón adecuado. En la presente descripción, el término anticuerpo se refiere a un anticuerpo entero o un fragmento de anticuerpo; entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque no se limitan a los mismos, fragmentos F(ab')₂ y Fab', o anticuerpos de cadena sencilla.

15 Para los fines de la presente descripción, el término "anticuerpo primario específico para la procalcitonina" se refiere a cualquier anticuerpo capaz de unirse selectivamente a cualquier parte de la procalcitonina.

20 El desarrollo de anticuerpos selectivos para una determinada proteína se lleva a cabo mediante técnicas convencionales recogidas en los manuales de laboratorio, y también es ofrecido como servicio por parte de numerosas empresas. Por consiguiente, no resulta necesario especificar más detalles en la presente descripción sobre la generación de unos anticuerpos que también se pueden adquirir a través de las correspondientes empresas.

25 Por consiguiente, a fin de generar un anticuerpo primario específico para la procalcitonina, cualquier técnica estándar es suficiente para desarrollar anticuerpos policlonales o monoclonales. Además, también se encuentran disponibles en el mercado anticuerpos específicos para la procalcitonina (por ejemplo, algunos anticuerpos comerciales que se pueden utilizar son los anticuerpos comerciales de la empresa Abcam con el código ab53897 (policlonal de conejo), ab90489 (monoclonal de ratón), ab24454 (monoclonal de ratón conjugado con HRP), ab14817 (monoclonal de ratón conjugado con HRP)), que se pueden utilizar para los fines de la presente invención sin que se faciliten más detalles al respecto en la presente descripción. Los detalles de los protocolos de incubación de anticuerpos primarios son bien conocidos por los técnicos del sector y, si se utilizan anticuerpos comerciales, los detalles se indican en las instrucciones del proveedor. Estos protocolos de incubación incluyen la utilización de tampones adecuados, tales como PBS (solución salina tamponada con fosfato), o, si se utilizan anticuerpos comerciales, tampones específicamente recomendados por el fabricante.

30 A fin de detectar el anticuerpo primario, éste se puede marcar con cualquier compuesto de uso habitual en el marcaje de anticuerpos y se puede utilizar un fluoróforo, en particular seleccionándose de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665 o una enzima tal como fosfatasa o peroxidasa alcalina.

35 Alternativamente, si se utiliza un anticuerpo primario, que no está marcado directamente, el mismo se puede detectar utilizando cualquier anticuerpo secundario marcado que reconozca selectivamente dicho anticuerpo primario. Tal como es conocido en la bibliografía, un anticuerpo secundario es específico para la región constante del anticuerpo primario, también conocida como porción Fc, que a su vez depende del tipo de animal utilizado para el desarrollo del propio anticuerpo primario. En otras palabras, el tipo de animal utilizado para la inmunización con el epítipo en cuestión (anticuerpo primario) es lo que define la naturaleza del anticuerpo secundario, por lo que, por ejemplo, si el anticuerpo primario se obtiene de un conejo, el secundario será un anticuerpo anti-conejo; si el animal inmunizado es una oveja, el anticuerpo secundario será un anticuerpo anti-oveja; si el anticuerpo primario se desarrolla en un ratón, el anticuerpo secundario será un anticuerpo secundario anti-ratón, etc.

40 El anticuerpo secundario se puede marcar con cualquier compuesto de uso habitual en el marcaje de anticuerpos y se puede utilizar un fluoróforo, en particular seleccionándose de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665 o una enzima tal como fosfatasa o peroxidasa alcalina.

45 En una forma de realización, la concentración de procalcitonina se puede determinar utilizando un anticuerpo primario anti-procalcitonina, por ejemplo, un anticuerpo policlonal conjugado con un marcador fluorescente, tal como europio, y un anticuerpo secundario anti-procalcitonina que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el anticuerpo primario, tal como un anticuerpo monoclonal conjugado con un marcador fluorescente, tal como XL665.

50 El procedimiento según la presente invención se puede llevar a cabo manualmente o utilizando cualquier instrumento conocido por el experto en la materia que sea capaz de realizar dicho procedimiento automáticamente, por ejemplo, instrumentos de laboratorio como Kryptor BRAHMS u otros procedimientos utilizados para la determinación de la procalcitonina plasmática (por ejemplo, LUMItest[®] PCT-LIAISON[®], BRAHMS PCT[®]-Q).

55 En una forma de realización, el valor de la concentración de procalcitonina en la orina se compara con uno o más valores que indican la presencia o ausencia de infecciones de las vías urinarias, siendo indicativa una concentración inferior a 0,05 ng/ml de la ausencia de infección de las vías urinarias y/o siendo indicativa una concentración superior a 0,3 ng/ml de la presencia de infección de las vías urinarias.

En una forma de realización, el procedimiento según la presente invención puede incluir una etapa adicional en la que el valor de la concentración de procalcitonina en la orina se compara con el valor de la concentración de procalcitonina en el plasma, de modo que una relación entre la concentración de procalcitonina en la orina y la concentración de procalcitonina en el plasma superior a 1 indica la presencia de infección de las vías urinarias. El objeto de la presente invención es también la utilización de un kit para el diagnóstico y/o el pronóstico *in vitro* de infecciones de las vías urinarias, que incluye alícuotas de los reactivos necesarios para determinar la concentración de procalcitonina en una muestra de orina y, opcionalmente, una muestra de plasma.

Así, por primera vez se ha dado a conocer un instrumento rápido que se puede utilizar para identificar los pacientes que padecen una infección urinaria y/o para monitorizar el curso de la infección y aplicar un determinado protocolo de tratamiento.

En su forma más simple, dicho kit contiene una o más alícuotas de un anticuerpo anti-calcitonina específico y un folleto adjunto que contiene, por ejemplo, las instrucciones para la interpretación de los resultados del diagnóstico y, opcionalmente, elementos para recoger y almacenar la muestra de orina y/o de plasma. Para los fines de la presente descripción, en el kit reivindicado en el presente documento se puede incluir cualquier anticuerpo que pueda unirse selectivamente a la procalcitonina. En particular, el kit puede contener uno o más anticuerpos anti-procalcitonina, cada uno desarrollado, por ejemplo, para un epítipo diferente de la proteína, y dicho anticuerpo es posiblemente capaz de conjugarse con marcadores habituales de anticuerpos, tales como fluoróforos o enzimas. En su caso, el kit puede incluir la utilización de anticuerpos monoclonales y/o policlonales anti-procalcitonina disponibles en el mercado. El kit también puede contener folletos adjuntos. Estos folletos pueden indicar los componentes del kit y el protocolo recomendado. Además, las instrucciones también pueden contener información relativa a la interpretación del valor de procalcitonina obtenido para las muestras de orina y de plasma analizadas, y, en particular, como se ha indicado anteriormente, una concentración de procalcitonina en la orina inferior a 0,05 ng/ml indica la ausencia de infección de las vías urinarias, una concentración superior a 0,3 ng/ml indica la presencia de infección de las vías urinarias y una relación PCTur/PCTpl > 1 indica la presencia de infección de las vías urinarias, siendo PCTur la procalcitonina urinaria del paciente y siendo PCTpl la procalcitonina plasmática.

El kit también puede contener una o más alícuotas de un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario, como saben los expertos en la materia y tal como se ha indicado anteriormente, debe ser capaz de reconocer específicamente la parte constante del anticuerpo primario utilizado; por consiguiente, la elección del anticuerpo secundario depende del animal inmunizado con el epítipo correspondiente. El anticuerpo secundario se puede marcar con cualquier compuesto de uso habitual en el marcaje de anticuerpos.

El kit también puede contener una o más alícuotas de controles negativos y/o positivos. Un control negativo se refiere a cualquier muestra de orina o de plasma de un paciente que no presenta ninguna infección de las vías urinarias. En una forma de realización particular, el control negativo puede estar representado por una muestra de orina con una concentración de procalcitonina inferior a 0,05 ng/ml.

El control positivo permite evaluar la exactitud del procedimiento realizado y la posible validez de los métodos utilizados, ya que puede contener la muestra de plasma u orina de un paciente con una infección de las vías urinarias. En particular, de la forma más adecuada pero sin limitarse a la presente invención, el control positivo es una muestra de orina con una concentración de procalcitonina superior a 0,3 ng/ml.

El kit también puede contener una o más alícuotas de reactivos para la detección de la procalcitonina en la orina y/o el plasma. Estos reactivos consisten en cualquier solución útil para la realización de las diversas etapas que conducen a la identificación del valor de concentración de procalcitonina en la muestra analizada. En particular, se pueden utilizar soluciones tampón, por ejemplo y sin limitación, PBS (solución salina tamponada con fosfato); una solución de bloqueo, tal como PBS complementado con albúmina de suero bovino. El objeto de la presente invención es también la utilización de la procalcitonina en el diagnóstico, el seguimiento y la evaluación de la gravedad de las infecciones de las vías urinarias, tales como las infecciones asociadas al uso de un catéter urinario, utilizando una muestra de orina.

A continuación se indican los resultados experimentales y se exponen los ejemplos destinados a ilustrar los datos contenidos en la presente descripción: estos ejemplos no deben considerarse limitativos de la descripción anterior ni de las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de la población utilizada en un estudio clínico de pacientes con sospecha de infección de las vías urinarias:

Se reclutaron para un estudio clínico pacientes ingresados en la UCI con sospecha de infección de las vías urinarias. Todos los pacientes se sometieron simultáneamente a los siguientes análisis:

- análisis de orina estándar (examen químico y físico) y cultivo de orina;
- PCT plasmática;
- PCT urinaria.

A partir de los resultados de los cultivos de orina, se inscribieron 10 sujetos con cultivo urinario positivo y 10 sujetos con cultivo urinario negativo.

5 Se inscribieron un total de 20 pacientes (9 mujeres y 11 varones) con una edad media de 70 años. La edad de los pacientes seleccionados variaba entre los 33 y los 91 años.

Cada uno de los pacientes tenía que presentar, como mínimo, uno de los siguientes criterios de inclusión:

- 10
- Fiebre o hipotermia;
 - Leucocitosis/leucopenia;
 - Dolor lumbar y/o disuria;
 - Otros signos inexplicables de SIRS;
 - Fiebre de origen desconocido;
- 15
- UTI recurrente.

Los criterios de exclusión eran:

- 20
1. oliguria/anuria;
 2. presencia de ureterosigmoidostomía;
 3. anomalías renales que impedían obtener una muestra adecuada de orina;
 4. insuficiencia hepática.

25 El cultivo de orina se considera positivo si se desarrollan 10^5 UFC/ml para no más de dos microorganismos (etiología polimicrobiana en el 14-30% de los casos). En el caso de *Candida spp.*, el umbral de significación se consideró 10^4 UFC/ml. También para los organismos grampositivos (especialmente enterococos y estafilococos que no expresan coagulasa) y, en caso de tratamiento antimicrobiano, existe la tendencia a considerar significativo un recuento de menos de 10^5 UFC/ml.

30 Resultados del estudio clínico

Se puso de manifiesto que la población con un cultivo urinario positivo tenía una PCT urinaria superior a la PCT plasmática en 9 de cada 10 casos (figura 1).

35 El valor medio de PCT urinaria fue de 1,4 ng/ml, mientras que el valor medio de PCT plasmática fue de 0,4 ng/ml. La PCT urinaria estaba comprendida entre 0,36 ng/ml y 2,54 ng/ml, mientras que la PCT plasmática estaba comprendida entre 0,06 ng/ml y 1,22 ng/ml.

40 El valor mediano de PCT urinaria fue de 1,25 ng/ml y el valor mediano de PCT plasmática fue de 0,24 ng/ml.

45 La relación entre la PCT urinaria y la PCT plasmática adoptó un valor comprendido entre 0,8 ng/ml y 25,33 ng/ml, un valor medio de 7,32 ng/ml y un valor mediano de 4,86 ng/ml. La temperatura media de los sujetos fue de 37,02°C, con 1 paciente que presentaba una temperatura <35°C, 3 pacientes que presentaban una temperatura ≥36°C y <37°C, 4 pacientes que presentaban una temperatura ≥37°C y <38°C y 2 pacientes que presentaban una temperatura de 38°C.

El número de leucocitos (nv 4,50 a 10,00 x $10^3/\mu\text{l}$) estaba comprendido entre 5,37 y 22,12 x $10^3/\mu\text{l}$, con una media de 12,22 x $10^3/\mu\text{l}$ y una mediana de 11,55 x $10^3/\mu\text{l}$.

50 El porcentaje de neutrófilos (nv 40,0% al 75,0%) estaba comprendido entre el 67,3% y el 88,4%, con una media de 78,8%.

La creatinina de los sujetos (nv 0,50 mg/dl a 0,90 mg/dl) estaba comprendida entre un mínimo de 0,3 mg/dl y un máximo de 2,85 mg/dl, con una media de 0,78 mg/dl.

55 Para calcular el valor del aclaramiento de creatinina se utilizó la siguiente fórmula de Cockcroft-Gault:

- varones $[(140 - \text{edad}) \times \text{peso corporal (kg)}] / (\text{creatinina sérica} \times 72)$
- mujeres $[(140 - \text{edad}) \times \text{peso corporal (kg)}] \times 0,85 / (\text{creatinina sérica} \times 72)$.

60 En los sujetos sometidos a estudio, el aclaramiento estaba comprendido entre 27 ml/min y 226,8 ml/min, con una media de 129,16 ml/min y una mediana de 115,4 ml/min.

65 Se puso de manifiesto que la población con un cultivo urinario negativo tenía una PCT urinaria inferior a la PCT plasmática en todos los pacientes.

ES 2 484 720 T3

El valor medio de PCT urinaria fue de 0,6 ng/ml, mientras que el valor medio de PCT plasmática fue de 4,44 ng/ml. La PCT urinaria estaba comprendida entre 0,13 ng/ml y 1,38 ng/ml, mientras que la PCT plasmática estaba comprendida entre 0,35 ng/ml y 25,72 ng/ml.

5 El valor mediano de PCT urinaria fue de 0,36 ng/ml y el valor mediano de PCT plasmática fue de 1,36 ng/ml.

La relación entre la PCT urinaria y la PCT plasmática adoptó un valor comprendido entre 0,03 ng/ml y 0,9 ng/ml, un valor medio de 0,40 ng/ml y un valor mediano de 0,37 ng/ml.

10 La temperatura media de los sujetos fue de 37,7°C, con 1 paciente que presentaba una temperatura $\geq 36^\circ\text{C}$ y $< 37^\circ\text{C}$, 1 paciente que presentaba una temperatura $\geq 37^\circ\text{C}$ y $< 38^\circ\text{C}$ y 8 pacientes que presentaban una temperatura $\geq 38^\circ\text{C}$.

El número de leucocitos estaba comprendido entre 4,27 y 39,2 x 10³/ μl , con una media de 12,86 x 10³/ μl y una mediana de 8,61 x 10³/ μl .

15 El porcentaje de neutrófilos estaba comprendido entre el 65,5% y el 93,9%, con una media del 85,5%.

La creatinina de los sujetos estaba comprendida entre un mínimo de 0,55 mg/dl y un máximo de 1,61 mg/dl, con una media de 0,97 mg/dl.

20 Con la fórmula de Cockcroft-Gault, el aclaramiento de creatinina estaba comprendido entre 38,4 ml/min y 169,4 ml/min, con una media de 78,72 ml/min y una mediana de 76,1 ml/min.

25 En la población de pacientes con cultivo urinario negativo, se observaron valores de PCTur menores que los valores de PCTpl en los 10 pacientes de la población con cultivo urinario negativo, y en 1 único caso en la población con cultivo urinario positivo. (figura 2)

30 Este último paciente era el único sujeto inscrito que presentaba disfunción renal grave, lo que se puso de manifiesto por un valor de aclaramiento de creatinina de 27 ml/min, calculado según la fórmula de Cockcroft-Gault. Por consiguiente, es posible que en el sujeto con disfunción renal grave, la PCT se hubiera acumulado en el plasma, sin ser excretada adecuadamente a través de la orina, lo que habría llevado a un valor de PCTpl superior al valor de PCTur a pesar del cultivo positivo.

35 En la población con cultivo urinario positivo, la mediana de los valores de PCTur fue de 1,25 ng/ml, mientras que en la población con cultivo urinario negativo, este valor fue de 0,36 ng/ml, lo que indicaba una clara diferenciación entre los dos grupos.

40 Los valores medianos de PCTpl también ponen de manifiesto una diferencia significativa: en la población con cultivo urinario positivo, su valor (0,24 ng/ml) indica que la mayoría de los sujetos no tienen ninguna otra infección; mientras que en la población con cultivo urinario negativo, su valor (1,36 ng/ml) indica que la mayoría de los pacientes tienen una infección bacteriana. (figura 24)

45 Para evaluar si la precisión de la medición de la PCT se vio afectada por la utilización de la orina como matriz de muestra, se inyectó PCT recombinante en cinco muestras de orina y de suero de individuos sanos con una PCT no detectable y se midieron en el ensayo KRYPTOR PCT. La recuperación de la PCT en la orina fue el 20-30% menor que en el suero. Por consiguiente, el alcance de la disminución de la recuperación en la orina es relativamente pequeño y todas las conclusiones extraídas anteriormente se mantienen, incluso aunque la recuperación en la orina y en el suero no fueron idénticas. Los valores de PCT urinaria determinados en las muestras clínicas de la presente invención se pueden corregir mediante su multiplicación por 1,25 para tener en cuenta la recuperación reducida en la matriz de orina.

50 Análisis estadístico

55 Los datos extrapolados a partir de los resultados del estudio clínico se sometieron a análisis estadístico a fin de evaluar si una relación PCTur/PCTpl > 1 podría diagnosticar una infección de las vías urinarias con sensibilidad y especificidad.

	Pacientes con infección	Pacientes sin infección	Total
Ensayo +	A	b	A+b
Ensayo -	C	d	C+d
Total	A+c	B+d	
Ensayo +	9	0	9
Ensayo -	1	10	11
Total	10	10	20

La sensibilidad es la probabilidad de que un paciente infectado dé positivo en el ensayo, y en nuestro caso:

$$\text{Sensibilidad} = a / a + c = 9 / (9 + 1) = 0,9, \text{ es decir, el } 90\%.$$

5 La especificidad, por otro lado, es la probabilidad de que un sujeto sano dé negativo en el ensayo, y en nuestro caso:

$$\text{Especificidad} = d / b + d = 10 / (0 + 10) = 1, \text{ es decir, el } 100\%$$

10 También podemos calcular el valor predictivo positivo (VPP), que corresponde a la proporción de sujetos con un resultado positivo en los ensayos positivos y, por consiguiente, que se diagnostican correctamente como infectados:

$$\text{VPP} = a / a + b = 9 / (9 + 0) = 1, \text{ es decir, el } 100\%.$$

15 **Ejemplo 1: Medición de la procalcitonina plasmática**

La muestra de sangre para el análisis se extrae del paciente utilizando el kit KRYPTOR sensible a PCT de BRAHMS, un kit diseñado para dosis de procalcitonina en ensayos de inmunofluorescencia automatizados en muestras de suero o plasma humano (EDTA, heparina). Este método cuantitativo utiliza un anticuerpo policlonal anti-procalcitonina de oveja conjugado con un marcador fluorescente, criptato de europio y otras sustancias, tales como un tampón, que incluyen albúmina bovina, inmunoglobulina de ratón no inmunizado y fluoruro de potasio; un anticuerpo monoclonal anti-catacalcina de ratón, también conjugado con un marcador fluorescente XL665 y con tampón, albúmina bovina, inmunoglobulina de ratón, fluoruro de potasio; y finalmente está disponible, listo para su uso, un diluyente formado por suero humano, Kathon y EDTA.

20 La medición de la PCT en este ensayo se basa en la tecnología TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission), que mide la señal emitida por un inmunocomplejo con retardo de tiempo. La muestra se excita con un láser de nitrógeno a 337 nm y el dador (criptato) emite una señal fluorescente de larga duración del orden de milisegundos a 620 nm, mientras que el aceptor (XL 665) genera una señal de corta duración del orden de nanosegundos a 665 nm. Si se forma un inmunocomplejo, tanto la amplificación de la señal como la vida útil prolongada de la señal del aceptor se producen a 665 nm, y la señal se puede medir en microsegundos.

25 Las moléculas de PCT están intercaladas entre los dos anticuerpos y, midiendo la longitud de la señal, se obtiene el valor de PCT, que es directamente proporcional al tiempo de emisión de la señal.

30 **Ejemplo 2: Medición de la procalcitonina plasmática**

La muestra de orina se extrae mediante una jeringa en el sitio de drenaje adecuado del catéter urinario tras colocar una pinza en el flujo de salida y desinfectar. Se transfieren aproximadamente 4 ml de orina al tubo adecuado a fin de transportarlos al laboratorio de análisis. La determinación de la PCT urinaria una vez tomada la muestra se llevó a cabo según el protocolo indicado para la PCT plasmática, tal como se describe en el ejemplo 1.

35 **Bibliografía**

45 Hooton TM *et al*, Diagnosis, prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009, International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2010 Mar 1;50(5):625-63.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias, que comprende una etapa en la que se determina la concentración de procalcitonina en una muestra de orina de un paciente.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinación de la concentración de procalcitonina en el plasma de dicho paciente.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración de procalcitonina se determina mediante un anticuerpo primario específico para la procalcitonina.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo primario está marcado directamente con un fluorocromo seleccionado de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la concentración de procalcitonina se determina mediante un anticuerpo secundario marcado con un compuesto seleccionado de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo secundario es específico para dicho anticuerpo primario.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha infección de las vías urinarias está asociada al uso de un catéter urinario.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una etapa adicional en la que dicha concentración de procalcitonina en la orina se compara con uno o más valores, de modo que una concentración inferior a 0,05 ng/ml indica la ausencia de infecciones de las vías urinarias, y/o una concentración superior a 0,3 ng/ml indica la presencia de infecciones de las vías urinarias.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende una etapa adicional en la que dicho valor de la concentración de procalcitonina en la orina se compara con dicho valor de la concentración de procalcitonina en el plasma, de modo que una relación entre dicha concentración de procalcitonina en la orina y dicha concentración de procalcitonina en el plasma superior a 1, indica la presencia de infecciones de las vías urinarias.
- 40 10. Utilización de un kit para el diagnóstico y/o la monitorización *in vitro* de las infecciones de las vías urinarias, que utiliza una muestra de orina que comprende alícuotas de los reactivos necesarios para determinar la concentración de procalcitonina en una muestra de orina.
- 45 11. Utilización de un kit según la reivindicación 10, que comprende una o más alícuotas de un anticuerpo primario específico para la procalcitonina.
- 50 12. Utilización de un kit según la reivindicación 11, en la que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo marcado directamente con un compuesto seleccionado de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665.
- 55 13. Utilización de un kit según la reivindicación 12, que comprende además una o más alícuotas de un anticuerpo secundario marcado con un compuesto seleccionado de entre el grupo que comprende: hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, europio, samario, FITC, Cy3, Cy5, Cy2, Cy7, XL665.
14. Utilización de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que dichos reactivos comprenden una o más alícuotas de soluciones tampón y/o una o más alícuotas de soluciones de unión y/o una o más alícuotas de reactivos para la detección de anticuerpos marcados.
- 60 15. Utilización de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende además una o más alícuotas de un control negativo y/o una o más alícuotas de un control positivo.
- 65 16. Utilización de un kit según la reivindicación 15, en la que dicho control negativo es una muestra de orina con una concentración de procalcitonina inferior a 0,05 ng/ml y dicho control positivo es una muestra de orina con una concentración de procalcitonina superior a 0,3 ng/ml.
17. Utilización de la procalcitonina para el diagnóstico y/o la monitorización de las infecciones de las vías urinarias utilizando una muestra de orina.

18. Utilización de procalcitonina según la reivindicación 17, en la que dicha infección de las vías urinarias está asociada al uso de un catéter urinario.

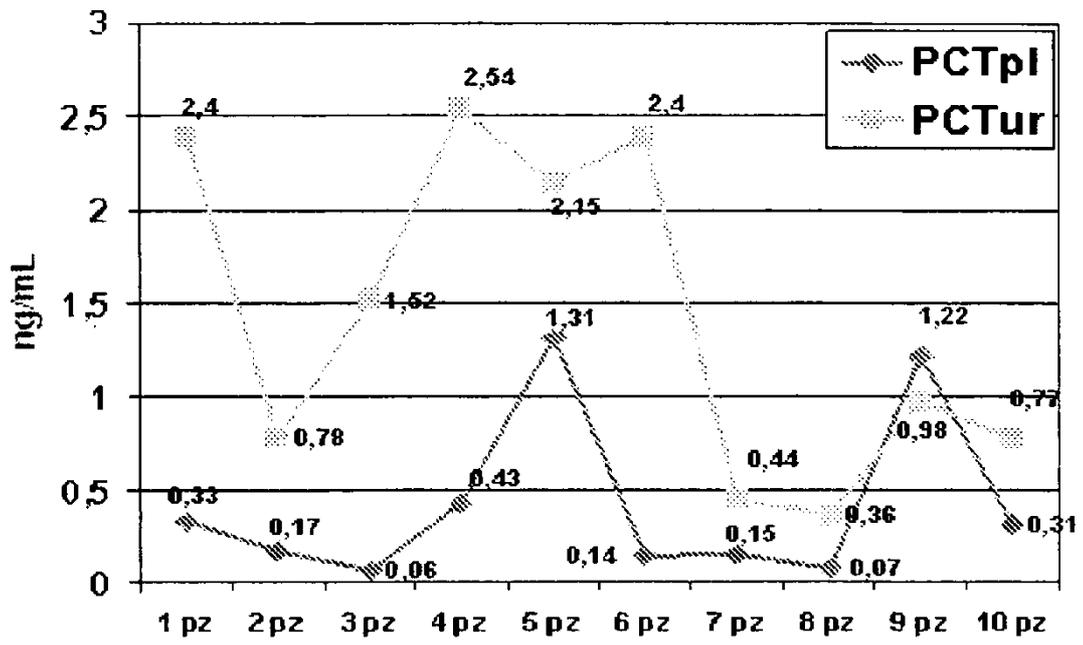


Fig. 1

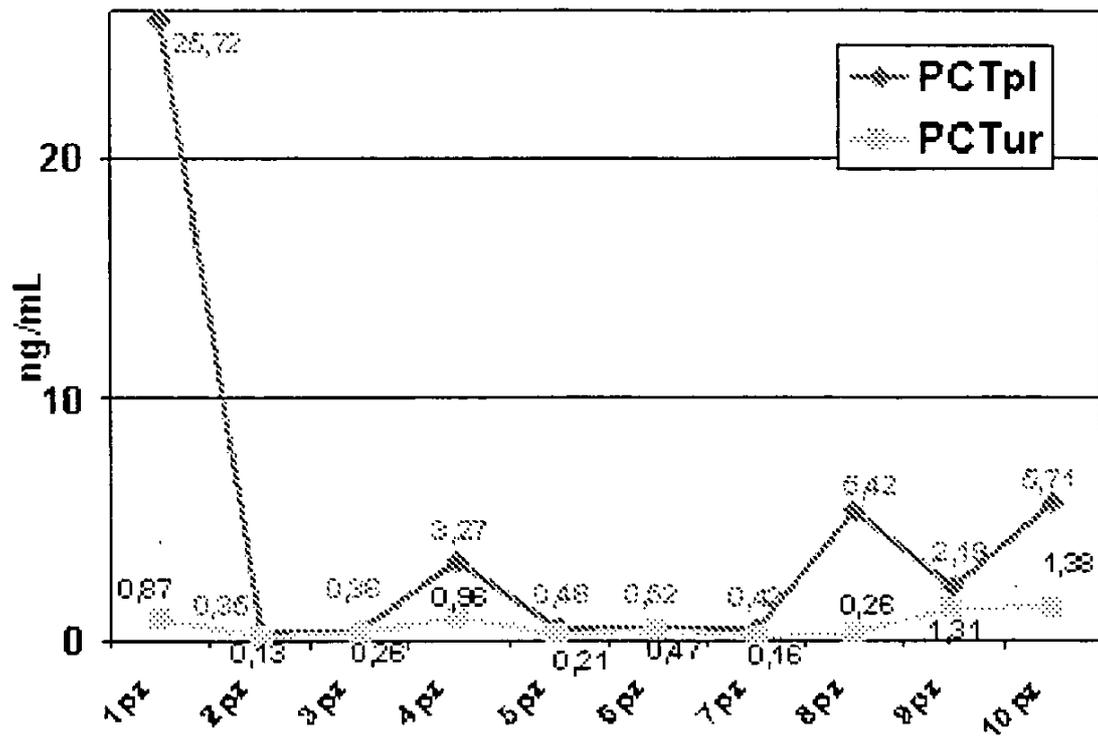


Fig. 2