

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 160**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012 E 12824297 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2743701**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico**

30 Prioridad:

12.08.2011 JP 2011176549

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

21.07.2016

73 Titular/es:

**LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**ENDO, SHIGEATSU y
FUKUI, YASUO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 578 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico y un kit para llevar a cabo el procedimiento.

Técnica antecedente

Las operaciones quirúrgicas se llevan a cabo en diversos campos, incluyendo cirugía, junto con el desarrollo de tecnología médica, y las infecciones de sitio quirúrgico han atraído la atención como un riesgo.

10 Las infecciones en el campo quirúrgico son causadas en el periodo perioperatorio antes o después de la cirugía. Más particularmente, como infecciones antes de cirugía, se conocen peritonitis (absceso intraperitoneal), pancreatitis grave e isquemia intestinal grave. En cuanto a infecciones después de cirugía, se conocen absceso intraperitoneal, infección por catéter, neumonía, e infección de las vías urinarias. Las infecciones de sitio quirúrgico muestran una gravedad elevada, y se requiere un diagnóstico rápido y preciso para decisiones de tratamiento tempranas.

15 En el actual diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico, el cultivo sanguíneo, el recuento de leucocitos, la temperatura corporal, imaginología de diagnóstico, la duración del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), descubrimientos bioquímicos sanguíneos tales como un valor de proteína C-reactiva (CRP), y similares, se usan como índice. De estos índices, el cultivo sanguíneo muestra una baja tasa positiva para infecciones, y requiere de 3 a 7 días para obtener los resultados del análisis y, por lo tanto, es difícil reflejar el tratamiento actualmente (Bibliografía no de patente 1). Además, la fiebre y el incremento del recuento de leucocitos y el nivel de CRP
20 inmediatamente después de cirugía son resultados naturales y, por lo tanto, estos son índices inespecíficos (Bibliografía no de patente 2). Aunque es conocido que un riesgo de transición a fallo multiorgánico se incrementa cuando el número de artículos positivos para SRIS se incrementa, la duración varía (aproximadamente de 1 a 3 días) debido a la tensión quirúrgica, y, por lo tanto, el número de artículos positivos para SRIS no es un marcador específico para infección. Además, recientemente se ha comenzado a usar ampliamente procalcitonina (PCT) como
25 marcador de infección bacteriana, pero es conocido que su nivel en sangre se incrementa también debido a herida, que no está acompañada por infección y es altamente invasiva, y que la PCT produce un resultado falso positivo en un diagnóstico de infección (Bibliografía no de patente 3).

30 Tal como se ha descrito anteriormente, aún no se han descrito marcadores eficaces en el diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico, y los médicos pasan verdaderos apuros para diagnosticar de infecciones de sitio quirúrgico, y el descubrimiento de dichos marcadores es muy deseado.

Lista de citas

Bibliografía no de patente

[Bibliografía no de patente 1] JAMA.1995; 273(2): 117-123
35 [Bibliografía no de patente 2] Shindan to Chiryō (diagnóstico y tratamiento). 2008; 96 (1): 61-66
[Bibliografía no de patente 3] Swiss Med Wkly. 2005; 135 (31-32): 451-460

Sumario de la invención

Problema técnico

40 Después de que se sospechen infecciones de sitio quirúrgico, se requiere una rápida determinación de un tratamiento apropiado. Un objeto de la presente invención es proporcionar un marcador eficaz en el diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico.

Solución al problema

45 Los inventores de la presente invención llevaron a cabo un estudio intensivo para resolver el objeto, y descubrieron que, cuando se sospechan infecciones de sitio quirúrgico, se mide sCD14-ST, que es un marcador específico que reacciona con una infección sin estar afectado por cirugía (herida), y las infecciones de sitio quirúrgico podrían detectarse tomando como base su grado o valor medido, y los inventores de la presente invención completaron la presente invención.

La presente invención se refiere a:

(1) un procedimiento de detección de infecciones de sitio quirúrgico, caracterizado por medir sCD14-ST en una muestra;
50 (2) un procedimiento de detección de infecciones de sitio quirúrgico, que comprende las etapas de:

medir sCD14-ST en una muestra recogida de un paciente del que se sospecha que tiene una infección de sitio quirúrgico o un paciente que padece una infección de sitio quirúrgico, y determinar que el paciente padece una infección de sitio quirúrgico cuando un valor de sCD14-ST es mayor que el de una persona no infectada;

- 5 (3) el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el valor de sCD14-ST se compara en la etapa de determinación con un umbral determinado previamente;
- (4) el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que sCD14-ST se mide mediante un inmunoensayo; y
- (5) un kit para detectar infecciones de sitio quirúrgico, que comprende:
- 10 (a) un anticuerpo específico para sCD14-ST,
- (b) datos estándar que muestran una correlación entre la cantidad de sCD14-ST en una muestra e infecciones de sitio quirúrgico, y
- (c) un manual de instrucciones.

15 La expresión "sCD14-ST humano" (también denominado Presepsin (marca registrada)) tal como se usa en el presente documento significa el "antígeno CD14 soluble del primer aspecto" desvelado en la patente japonesa N.º 4040666 y, más particularmente, es un antígeno CD14 soluble con las siguientes características 1) a 3):

- 1) Tener un peso molecular de 13 ± 2 kDa según lo medido mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras;
- 2) Tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en la secuencia N-terminal; y
- 20 3) Unirse específicamente a un anticuerpo preparado usando un péptido que consiste en 16 residuos de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 como antígeno.

SEQ ID NO: 1:

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu
1 5 10

SEQ ID NO: 2:

Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

25 El término "infecciones", tal como se usa en el presente documento, incluye infecciones por bacterias, hongos, parásitos o virus.

El procedimiento de confirmación de la presencia de infección no está particularmente limitado, pero ejemplos del mismo incluyen, además de un cultivo sanguíneo usado habitualmente, procedimientos de identificación de genes (tales como PCR y RP-PCR), imaginología de diagnóstico, diagnóstico ultrasónico, endoscopia y biopsia [Am. J. Infect. Control, 1988; 16: 128-140].

35 La expresión "infecciones de sitio quirúrgico", tal como se usa en el presente documento, significa enfermedades infecciosas que son causadas después de cirugía, e incluye todas las infecciones debidas a cirugía y terapia adyuvante necesaria para ella. Por lo tanto, están incluidas todas las infecciones, tales como una infección en la que se asocian heridas con el sitio de operación quirúrgica, una infección en la que heridas no están asociadas con el sitio de operación quirúrgica, una infección tópica, y una infección sistémica. Adicionalmente, incluso si ésta es una infección que es causada después del alta hospitalaria, o una infección que es causada por cirugía llevada a cabo en otro hospital, éstas están incluidas, siempre que sean causadas por un tratamiento o sitio relacionado con la cirugía.

40 El documento GUIDELINE FOR PREVENTION OF SURGICAL SITE INFECTION, 1999 es publicado por el Center for Disease Control and Prevention [Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades] (en lo sucesivo denominado CDC), y se desvelan criterios de diagnóstico, cirugía, tratamiento, prevención, y similares [INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY 1999; 20(4): 247-278]. Este documento también desvela que actualmente, los procedimientos quirúrgicos al año son 27 millones de casos, y que el sistema nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales del CDC (en lo sucesivo denominado NNIS) se fundó en 1970, y monitoriza infecciones nosocomiales en hospitales de cuidados intensivos. Basándose en informes del sistema NNIS, las infecciones de sitio quirúrgico (en lo sucesivo denominadas ISQ) son la tercera infección nosocomial notificada más frecuentemente, suponiendo del 14 % al 16 % de todas las infecciones nosocomiales entre pacientes hospitalizados. Durante el periodo de 1986 a 1996, los hospitales que llevaron a cabo vigilancia de ISQ en el sistema NNIS notificaron 15.523 ISQ después de 593.344 operaciones (CDC, datos no publicados). Entre los pacientes quirúrgicos, las ISQ fueron la infección nosocomial más común, suponiendo el 38 % de todas dichas infecciones. De estas ISQ, dos tercios estaban confinadas en la incisión, y un tercio implicaban órganos o espacios a los que se accedió durante la operación. Cuando los pacientes quirúrgicos con ISQ nosocomial murieron, se notificó que el 77 % de las muertes estaban relacionadas con la infección, y la mayoría (93 %) fueron infecciones graves que implicaban órganos o espacios a los que se accedió durante la operación. En 1980, Cruse estimó que una ISQ

incrementaba la estancia hospitalaria de un paciente en aproximadamente 10 días y el coste en \$2.000 adicionales. Un análisis en 1992 mostró que cada ISQ daba como resultado 7,3 días de hospitalización postoperatoria adicionales, añadiendo \$3.152 de costes extra. Tal como se ha descrito anteriormente, queda corroborado que las ISQ incrementan los días de hospitalización y el coste y, por lo tanto, se desea diagnosticar y tratar ISQ en una fase temprana.

El término “septicemia”, tal como se usa en el presente documento, significa un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) que es causado por una infección bacteriana. Es decir, la septicemia es un estado muy grave en el que una infección bacteriana se ha extendido por todo el cuerpo, y algunos de los pacientes sin tratamiento acaban muriendo debido a choque, CID, fallo multiorgánico, o similares. “Septicemia” significa un estado en el que un paciente cumple, además de la presencia de la infección mencionada anteriormente, por ejemplo, dos o más criterios de los siguientes cuatro criterios, que son los criterios para el diagnóstico del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) [Chest, 1992; 101 (6): 1644-1655]:

- 1) Temperatura corporal $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 2) Frecuencia cardiaca >90 por minuto;
- 3) Frecuencia respiratoria >20 por minuto o $\text{PaCO}_2 >32$ torr; y
- 4) Recuento de leucocitos >12.000 , $< 4.000/\text{m}^3$ o leucocitos inmaduros $>10\%$;

El término “septicemia”, tal como se usa en el presente documento, incluye septicemia asociada con la fase final de septicemia, y el inicio de “septicemia grave”, “choque séptico” y “complicaciones de septicemia” (por ejemplo, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), coagulación intravascular diseminada (CID), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), e insuficiencia renal aguda (IRA)), e incluye todas las fases de septicemia, que no está limitada.

Aunque la septicemia puede tratarse mediante el uso de antibióticos o terapia de apoyo, sigue siendo una causa grave de mortalidad. De acuerdo con una estimación en un estudio reciente, 751.000 casos de septicemia grave se producen cada año en los Estados Unidos, y la tasa de mortalidad de los mismos es del 30 al 50 %. Los especialistas de cuidados intensivos o enfermedades infecciosas que pertenecen a la Society of Critical Care Medicine (SCCM), la European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), y el ISF (International Septicemia Forum) han establecido un programa internacional llamado la “Surviving Septicemia Campaign (SSC)” en 2002 para reducir la tasa de mortalidad de septicemia grave en un 25 % durante los próximos 5 años, y las Surviving Septicemia Campaign Guidelines (SSCG) han sido elaboradas como parte de la estrategia. Estas directrices se publicaron en 2004 como unas directrices para el diagnóstico/tratamiento de septicemia grave que se basa en primer lugar en evidencias, y su versión revisada se publicó en 2008 [Crit. Care Med., 2008; 36: 296-327]. Estas directrices se basan en una fluidoterapia inicial (terapia temprana dirigida por metas) o similar para septicemia grave [New Engl. J. Med., 2001; 345: 1368-1377].

Los ejemplos de los tratamientos para septicemia descritos en las presentes directrices incluyen el uso de agentes antimicrobianos, fluidoterapia, vasoconstrictores, fármacos cardiacos, terapia con esteroides, preparaciones sanguíneas, control de la glucemia, procedimientos de purificación sanguínea [por ejemplo, hemofiltración continua (HFC), hemodiafiltración continua (HDFC), y hemodiálisis (HD)], cirugía (por ejemplo, drenaje de abscesos y extirpación de tejido necrótico infectado), y similares, así como una terapia de adsorción de endotoxinas (PMX) y preparaciones de γ -globulina [Crit. Care Med., 2008; 36: 296-327]. Los agentes terapéuticos para septicemia no están limitados a los fármacos descritos anteriormente, y es posible remitirse, por ejemplo, al documento “Konnichi no Chiryō-yaku - Kaisetsu to Binran 2006 (Fármacos terapéuticos actuales - Explicaciones y Manuales 2006)”, editado por Yutaka MIZUSHIMA, Nankodo Co., Ltd., 2006, o similares.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la aparición de infecciones de sitio quirúrgico puede detectarse rápidamente y de forma precisa y, por lo tanto, puede determinarse un tratamiento apropiado. Por ejemplo, un marcador convencional (procalcitonina) se incrementa debido a los efectos de una operación quirúrgica y, por lo tanto, una infección después de cirugía no puede distinguirse de los efectos de la operación quirúrgica. Sin embargo, el marcador (sCD14-ST) usado en la presente invención no está afectado por la cirugía y, por lo tanto, una infección después de la cirugía puede detectarse específicamente.

El kit de la presente invención puede usarse en el procedimiento de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los cambios en cada índice (sCD14-ST, PCT, temperatura corporal y recuento de leucocitos (RL)) en un caso en el que no se causaron infecciones de sitio quirúrgico.

[FIG. 2] La figura 2 es un gráfico que muestra los cambios en cada índice (sCD14-ST, PCT, temperatura corporal y recuento de leucocitos (RL)) en un caso en el que se causó una infección de sitio quirúrgico.

Descripción de realizaciones

- En el procedimiento de detección de la presente invención (en lo sucesivo denominado el procedimiento de la presente invención), se mide sCD14-ST en una muestra recogida de un sujeto, en particular, un paciente sospechoso de tener una infección de sitio quirúrgico o un paciente que padece una infección de sitio quirúrgico.
- 5 Dichos sujetos no están particularmente limitados, siempre que las infecciones de sitio quirúrgico sean infecciones que son causadas después de cirugía, y los sujetos incluyen pacientes que padecen una infección que es causada después de cirugía y requiere un tratamiento antimicrobiano, o una infección agravada (en particular, septicemia) que es causada después de cirugía.
- Se conocen procedimientos de medición de sCD14-ST, y la medición puede llevarse a cabo mediante diversos procedimientos analíticos conocidos para procedimientos, por ejemplo, un inmunoensayo usando un anticuerpo o un ensayo bioquímico tal como electroforesis, y también puede usarse un autoanalizador para un ensayo de laboratorio clínico. Los procedimientos analíticos que usan una sustancia con propiedades similares a las de un anticuerpo, tales como un aptámero de ARN, están incluidos en la presente invención.
- 10 Por ejemplo, la patente japonesa N.º 4040666 desvela un procedimiento de medición de sCD14-ST humano, más particularmente, sistemas de EIA sándwich que usan combinaciones de un anticuerpo policlonal (anticuerpo S68) o un anticuerpo monoclonal (anticuerpo F1146-17-2), que se prepararon usando un péptido que consiste en 16 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (el péptido S68 descrito en la patente japonesa N.º 4040666) como antígeno, y anticuerpos monoclonales anti-antígeno CD14 (por ejemplo, anticuerpo F1031-8-3, anticuerpo F1106-13-3, o similares) [Ejemplo 7-(1) en la patente japonesa N.º 4040666], y estos pueden aplicarse al procedimiento de la presente invención.
- 15 Además, tal como se muestra en los ejemplos descritos a continuación, sCD14-ST puede medirse usando un analizador de inmunoensayo quimioluminiscente automatizado (PATHFAST; fabricado por Mitsubishi Chemical Medience Corporation) mediante un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente que usa partículas magnéticas.
- Una muestra usada en la presente invención no está particularmente limitada, siempre que pueda medirse sCD14-ST. Por ejemplo, pueden usarse muestras de sangre (tales como sangre completa, plasma o suero).
- 20 En el procedimiento de la presente invención, un incremento de la concentración de sCD14-ST en una muestra se usa como índice de infecciones de sitio quirúrgico. Por ejemplo, tal como se muestra en el ejemplo 2 descrito a continuación, cuando una infección es causada después de la cirugía, el nivel de sCD14-ST se incrementa. El día 7 después de la cirugía, en el que se confirmó una infección mediante cultivo, el nivel de sCD14-ST fue de 978 pg/ml. Este nivel era el mismo que el del día 5 después de la cirugía. Tal como se ha descrito anteriormente, en el procedimiento de la presente invención, cuando el nivel de sCD14-ST muestra un valor elevado después de la cirugía, puede determinarse que una infección es causada, y puede determinarse más fácilmente y de forma precisa en comparación con un procedimiento de cultivo convencional. En contraste, cuando el nivel de sCD14-ST muestra un valor bajo, puede determinarse que no se causa ninguna infección. Por ejemplo, cuando el nivel de sCD14-ST en una muestra es mayor que un valor de cuantil (por ejemplo, mediana) de personas sanas, puede determinarse que una infección es causada. En contraste, cuando el nivel de sCD14-ST en una muestra es el mismo que o inferior a un valor de cuantil (por ejemplo, mediana) de personas sanas, puede determinarse que no se causa ninguna infección. Además, la determinación puede llevarse a cabo mediante técnicas estadísticas tales como regresión de Cox o regresión logística. Como criterio para la determinación, puede usarse un “valor umbral” determinado de antemano.
- 30 En el procedimiento de la presente invención, aunque se espera que el valor umbral para el nivel de sCD14-ST para detectar infecciones de sitio quirúrgico varíe de acuerdo con diversas condiciones, tales como el sexo o la edad, el valor umbral para la determinación puede determinarse para los expertos en la materia seleccionando apropiadamente una población adecuada que corresponde a los sujetos, y procesando estadísticamente los datos adquiridos a partir de la población. Como población, puede seleccionarse un grupo de personas sanas, un grupo sin infección, un grupo con infección, un grupo con septicemia, grupos sépticos de diferente nivel patológico, grupos sépticos de diferentes tipos patológicos, o similares. En el ejemplo 2 descrito a continuación, un valor límite óptimo de 891 pg/ml se ha determinado tomando como base el valor “promedio + 2×DT” de la concentración de sCD14-ST en el momento en el que no se causaba ninguna infección. En el procedimiento de la presente invención, es posible detectar automáticamente infecciones de sitio quirúrgico, sin requerir determinación de un médico, determinando el valor umbral para la determinación, y comparando la concentración de sCD14-ST medida en una muestra con el valor umbral para la determinación.
- 35 El valor límite para detectar infecciones de sitio quirúrgico es preferentemente de 200 a 5000 pg/ml, más preferentemente de 300 a 3000 pg/ml, y de la forma más preferente de 500 a 1000 pg/ml.
- 40 En el procedimiento de la presente invención, aunque el momento para la recogida de muestras es preferentemente en una fase en la que se han generado sospechas de infecciones de sitio quirúrgico, o una fase después del tratamiento, la muestra puede recogerse a lo largo del tiempo después de la cirugía. Por ejemplo, la muestra puede recogerse en el plazo de aproximadamente 7 a 10 días después de la cirugía.
- 45
- 50
- 55

El kit de la presente invención puede usarse para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención e incluye:

- (a) un anticuerpo específico para sCD14-ST;
- (b) datos estándar que muestran una correlación entre la cantidad de sCD14-ST en una muestra e infecciones de sitio quirúrgico; y
- (c) un manual de instrucciones.

El anticuerpo usado en el kit de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Además, un fragmento de anticuerpo que conserva una actividad de unión específica a sCD14-ST, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv, puede usarse en el kit.

Además, el anticuerpo puede usarse, como tal, en el kit, o puede usarse en el kit en una forma adecuada basándose en la técnica inmunológica a emplear, por ejemplo, inmovilizándolo sobre un portador de látex cuando se emplea un inmunoensayo de aglutinación en látex, inmovilizándolo sobre partículas magnéticas cuando se emplea un procedimiento de medición altamente sensible usando partículas magnéticas o similares, inmovilizándolo sobre un sustrato cuando se emplea un procedimiento que usa un sustrato, tal como una inmunocromatografía, o marcándolo con sustancias de marcado (por ejemplo, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, isótopos radiactivos, biotina, o avidina) si fuera necesario.

Los datos estándar incluidos en el kit de la presente invención no están particularmente limitados, siempre que muestren una correlación entre la cantidad de sCD14-ST en una muestra e infecciones de sitio quirúrgico, y sus ejemplos incluyen un valor umbral para la determinación, y datos originales o datos procesados estadísticamente para calcular el valor umbral para la determinación. Los datos estándar pueden describirse en el manual de instrucciones, o pueden adjuntarse por separado como una ficha de datos. Además, la forma del documento adjunto incluye papel, medios electrónicos tales como CD-ROM, y las descargadas desde páginas de inicio o similares.

El manual de instrucciones incluido en el kit de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que se refiera al menos a la relación entre la cantidad de sCD14-ST en una muestra e infecciones de sitio quirúrgico. Además de la referencia anterior, el manual de instrucciones puede incluir, por ejemplo, la explicación relacionada con el procedimiento para llevar a cabo una medición inmunológica usando el kit de la presente invención, la explicación respecto al procedimiento para predecir el pronóstico se basan en los valores de medición obtenidos, las precauciones respecto al almacenamiento y el manejo del kit *per se*, o similares.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación mediante, aunque no se limita en absoluto a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: procedimientos de medición de sCD14-ST y procalcitonina

La medición de sCD14-ST se llevó a cabo modificando el procedimiento descrito en el ejemplo 7-(1) de la patente japonesa N.º 4040666. Más particularmente, se usaron un anticuerpo policlonal (anticuerpo S68) marcado con fosfatasa alcalina (ALP) y un anticuerpo monoclonal (anticuerpo F1031-8-3) inmovilizado sobre partículas magnéticas (fabricadas por JSR), y la medición se llevó a cabo usando un analizador de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente automatizado (PATHFAST; fabricado por Mitsubishi Chemical Medience Corporation). El anticuerpo policlonal (anticuerpo S68) marcado con fosfatasa alcalina (ALP) se preparó preparando una fracción Fab' del anticuerpo policlonal (anticuerpo S68) y enlazándola con ALP mediante un procedimiento con maleimida. Se usó CPD-star (fabricado por Applied Biosystems) como sustrato luminiscente.

La medición se llevó a cabo de la siguiente manera. Se hizo reaccionar una muestra con el anticuerpo inmovilizado sobre partículas magnéticas y el anticuerpo marcado con ALP, para formar un complejo compuesto por sCD14-ST contenido en la muestra y ambos anticuerpos. El complejo se recogió mediante un cuerpo magnético para eliminar el anticuerpo marcado con ALP no unido de la mezcla de reacción. El sustrato luminiscente se añadió para detectar la cantidad de la luminiscencia como la cantidad de sCD14-ST.

La medición de procalcitonina (PCT) se llevó a cabo usando ECLusys (fabricado por Roche) y su agente de medición dedicado, ECLusys BRAHMS PCT (fabricado por Roche).

1

Ejemplo 2: Presencia o ausencia de infecciones de sitio quirúrgico y cambios en cada índice a lo largo del tiempo

Con respecto a un caso (58 años de edad, varón) en el que no se causaron infecciones de sitio quirúrgico después de cirugía de cáncer esofágico, y un caso (71 años de edad, varón) en el que se causó una infección de sitio quirúrgico, se analizó la relación entre la presencia o ausencia, o desarrollo cronológico de infecciones de sitio quirúrgico y cada índice. Más particularmente, después de 0, 1, 3, 5 y 7 días desde la cirugía, se recogieron muestras de sangre completa en EDTA o muestras de plasma en EDTA a lo largo del tiempo, y se midieron sCD14-ST y PCT usando las muestras de sangre completa en EDTA y las muestras de plasma en EDTA, respectivamente.

Adicionalmente, una temperatura corporal, un recuento de leucocitos (RL), y el número de artículos positivos para SRIS se determinaron en cada punto de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, con respecto al número de artículos positivos para SRIS, a un paciente que cumplía dos o más artículos de los siguientes artículos:

- 1) Temperatura corporal $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 2) Frecuencia cardíaca >90 por minuto;
- 3) Frecuencia respiratoria >20 por minuto o $\text{PaCO}_2 >4,3\text{ kPa}$; y
- 4) Recuento de leucocitos >12.000 , $< 4.000/\text{m}^3$ o leucocitos inmaduros $>10\%$;

se le diagnosticó SRIS.

En el caso en el que se causó una infección de sitio quirúrgico, se detectó *Stenotrophomonas maltophilia* en un ensayo de cultivo de esputo el día 7 después de la cirugía, y se confirmó que se causó una infección.

Los cambios en cada índice en el caso en el que no se causaron infecciones de sitio quirúrgico, se muestran en la tabla 1 y la figura 1, y los cambios en cada índice en el caso en el que se causó una infección de sitio quirúrgico se muestran en la tabla 2 y la figura 2.

En el caso en el que se causó una infección de sitio quirúrgico, se observó un incremento del valor medido de sCD14-ST el día 5 después de la cirugía, y este valor era aproximadamente 2,5 veces tal alto como el del día 0 después de la cirugía. Este resultado fue coherente con el evento mencionado anteriormente, y se descubrió que podría detectarse una infección en una fase temprana. En contraste, con respecto a otros índices, PCT, temperatura corporal, RL, y diagnóstico de SRIS, no se mostraron cambios significativos en ambos casos, y la relación con la infección no se observó, y por lo tanto, se descubrió que era difícil detectar infecciones de sitio quirúrgico tomando como base estos índices. Por lo tanto, se descubrió que sCD14-ST era eficaz como procedimiento de la presente invención para detectar infecciones de sitio quirúrgico.

Adicionalmente, el valor "promedio + 2×DT" de la concentración de sCD14-ST en el momento en que no se causaron infecciones era de 891 pg/ml, y este resultado sugería que podría determinarse que un paciente padecía una infección de sitio quirúrgico cuando la concentración de sCD14-ST era de aproximadamente 900 pg/ml o más.

25

Tabla 1

Artículos	sCD14-ST (pg/ml)	PCT (ng/ml)	Temp. corporal (°C)	RL (recuento/mm ³)	Diagnóstico de SRIS (Número de artículos positivos)
Inmediatamente después de la cirugía	549	0,073	36,3	3600	No SRIS (1)
Día 1 después de la cirugía	658	0,430	37,5	3880	No SRIS (1)
Día 3 después de la cirugía	753	0,250	36,8	6830	No SRIS (0)
Día 5 después de la cirugía	738	0,147	36,2	6210	No SRIS (0)
Día 7 después de la cirugía	694	0,336	36,5	7380	No SRIS (0)

Tabla 2

Artículos	sCD14-ST (pg/ml)	PCT (ng/ml)	Temp. corporal (°C)	RL (recuento/mm ³)	Diagnóstico de SRIS (Número de artículos positivos)
Inmediatamente después de la cirugía	410	0,084	36,0	3810	No SRIS (0)
Día 1 después de la cirugía	684	0,504	38,5	5920	No SRIS (1)

(continuación)

Artículos	sCD14-ST (pg/ml)	PCT (ng/ml)	Temp. corporal (°C)	RL (recuento/mm ³)	Diagnóstico de SRIS (Número de artículos positivos)
Día 3 después de la cirugía	407	0,524	37,6	6980	No SRIS (1)
Día 5 después de la cirugía	970	0,427	36,7	9090	No SRIS (1)
Día 7 después de la cirugía	978	0,306	36,9	8340	No SRIS (1)

Aplicabilidad industrial

5 Fue un resultado sorprendente que sCD14-ST, que era conocido como marcador para septicemia, podría usarse en la detección específicamente, no solo de infecciones sistemáticas graves tales como septicemia, sino también infecciones no acompañadas por SRIS. Adicionalmente, dado que un marcador para detectar específicamente infecciones de sitio quirúrgico sin ser afectado por operaciones de cirugía no se ha conocido, es tan eficaz que sCD14-ST pueda usarse en la presente invención como marcador para determinación o detección de estos acontecimientos.

10 De acuerdo con la presente invención, un paciente sospechoso de tener una infección de sitio quirúrgico o un paciente que padece una infección de sitio quirúrgico puede detectarse de forma fácil y precisa y puede ser útil para determinar una terapia en una fase temprana.

15 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, diversos cambios y modificaciones obvias para los expertos en la materia son posibles sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Mitsubishi Chemical Medience Corporación
- <120> Procedimiento de diagnóstico de infecciones de sitio quirúrgico
- <130> X1169 EP S3
- 20 <140> EP 12 82 4297.1
- <141> 10-08-2012
- <150> JP 2011-176549
- <151> 12-08-2012
- <160> 2
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu
1 5 10

- <210> 2
- <211> 16
- <212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
- <400> 2

ES 2 578 160 T3

Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* de detección de infecciones de sitio quirúrgico, **caracterizado por** medir sCD14-ST en una muestra.
2. Un procedimiento *in vitro* de detección de infecciones de sitio quirúrgico, que comprende las etapas de:
 - 5 medir sCD14-ST en una muestra recogida de un paciente del que se sospecha que tiene una infección de sitio quirúrgico o un paciente que padece una infección de sitio quirúrgico, y determinar que el paciente padece una infección de sitio quirúrgico cuando un valor de sCD14-ST es mayor que el de una persona no infectada.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el valor de sCD14-ST se compara en la etapa de determinación con un umbral determinado previamente.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que sCD14-ST se mide mediante un inmunoensayo.
5. Uso *in vitro* de un kit para detectar infecciones de sitio quirúrgico, que comprende:
 - 15 (a) un anticuerpo específico para sCD14-ST,
 - (b) datos estándar que muestran una correlación entre la cantidad de sCD14-ST en una muestra e infecciones de sitio quirúrgico, y
 - (c) un manual de instrucciones.
6. Uso de un anticuerpo específico para sCD14-ST para diagnóstico *in vitro* de infecciones de sitio quirúrgico.

Figura 1

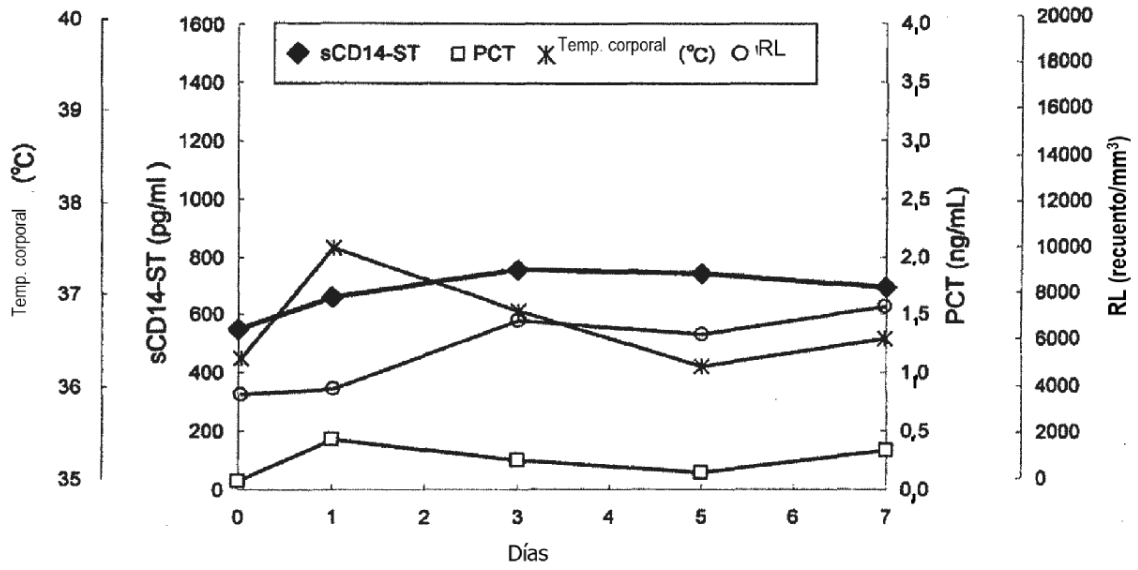


Figura 2

